

Aus dem Physiologischen Institut
- Abteilung für Angewandte Physiologie -
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

pH - VERTEILUNGEN IN MALIGNEN TUMOREN
UNTER NORMO- UND HYPERTHERMIE-BEDINGUNGEN

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Friedrich K a l l i n o w s k i

aus Neustadt a.d.Weinstraße

Mainz, 1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554411_0017

Aus dem Physiologischen Institut
- Abteilung für Angewandte Physiologie -
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

pH - VERTEILUNGEN IN MALIGNEN TUMOREN
UNTER NORMO- UND HYPERTHERMIE-BEDINGUNGEN

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Friedrich K a l l i n o w s k i

aus Neustadt a.d.Weinstraße

Mainz, 1985

Dekan : Professor Dr.med.J.Michaelis
1.Gutachter : Professor Dr.med.P.Vaupel
2.Gutachter : Professor Dr.rer.nat.Dr.med.G.Thews
3.Gutachter : Professor Dr.K.Meßmer

Tag der Promotion : 9.4.1986

Widmung

Es ist mir eine besondere Freude, diese Arbeit in tiefer Dankbarkeit und Verehrung meinen Eltern widmen zu können, ohne deren aufopfernde und selbstlose Unterstützung mein bisheriger Werdegang nicht möglich gewesen wäre.

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	7
2.1. Tiere und Tumoren	7
2.1.1. Isotransplantierte Yoshida-Sarkome in Sprague-Dawley-Ratten	7
2.1.2. Xenotransplantierte menschliche Mammarkarzinome in T-Lymphozyten-defizienten (rnu/rnu) Ratten .	7
2.1.3. Spontane Dysplasien, benigne und maligne Tumoren der Sprague-Dawley-Ratte	8
2.2. Versuchsserien	8
2.2.1. Tumortragende Tiere	8
2.2.2. Kontrollen (tumorfreie Tiere)	10
2.3. Versuchsdurchführung	10
2.3.1. Vorbereitung und Überwachung der Tiere während der Experimente	10
2.3.2. Überwärmung der Gewebe und Kontrolle der Gewebetemperatur	12
2.3.3. Messung der Gewebe-pH-Werte	14
2.4. Statistische Methoden	16
3. Ergebnisse	18
3.1. Gewebe-pH-Verteilungen unter Normothermie	18
3.1.1. Muskel und Subkutis	18
3.1.2. Tumoren	18
3.2. Veränderungen der pH-Verteilungen während und nach einer lokalisierten Ultraschall- überwärmung (44°C, 60 min)	22
3.2.1. Subkutis	22
3.2.2. Tumoren	23

3.3.	Volumenveränderungen der tumorfreien und der tumortragenden Rattenpfote während und nach einer lokalen Ultra- schallüberwärmung (44°C, 60 min)	26
3.4.	Veränderungen systemischer Parameter unter lokaler Ultraschallhyperthermie (44°C, 60 min)	27
4.	Diskussion	29
4.1.	Diskussion der Methoden	29
4.1.1.	Wahl der verwendeten Tumoren	29
4.1.2.	Wahl des Hyperthermieverfahrens	31
4.1.3.	Methodik der pH-Messung	33
4.2.	Diskussion der Ergebnisse	36
4.2.1.	pH-Verteilungen in Skelettmuskulatur und Subkutis unter Normothermie	36
4.2.2.	pH-Verteilungen in Tumoren unter Normothermie	38
4.2.3.	Änderungen der pH-Verteilungen in Normal- und Tumorgewebe unter lokalisierter Ultraschall- hyperthermie (44°C, 60 min)	48
5.	Zusammenfassung	59
6.	Literatur	63

1. EINLEITUNG

Aufgrund schwerwiegender Beeinträchtigungen des konvektiven und diffusiven Transportes treten in den meisten malignen Tumoren mit fortschreitendem Wachstum zunehmend mangelversorgte Gewebeareale auf (VAUPEL, 1974; GULLINO, 1975; VAUPEL, 1979; VAUPEL et al., 1981; VAUPEL, 1982a; VAUPEL und HAMMERSEN, 1983; VAUPEL und MÜLLER-KLIESER, 1983). Als Folge der verschlechterten Transportbedingungen wird das Tumorgewebe unzureichend mit Sauerstoff und mit Substraten des Energie- und Baustoffwechsels versorgt. Weiterhin werden die unter diesen Bedingungen vermehrt gebildeten sauren Stoffwechselendprodukte (z.B. Milchsäure und Ketonkörper) nicht mehr ausreichend abtransportiert (GULLINO et al., 1965; RAUEN et al., 1967; VAUPEL und THEWS, 1976; VAUPEL, 1977; SHAPOT, 1980). Die Bildung und die Akkumulation von Protonen führen zu einer Ansäuerung des Tumorgewebes, d.h. im Vergleich zu den Geweben am Ort der Tumorentstehung oder der Tumorimplantation treten in malignen Tumoren deutlich niedrigere pH-Werte auf.

Die "Tumorazidose" wurde in verschiedensten Tumoren unterschiedlichster Spezies (vor allem in Nagetiertumoren, aber auch in menschlichen Tumoren) mit einer Vielzahl von Methoden experimentell verifiziert. In der Mehrzahl der durchgeführten Untersuchungen wurde ein Absinken des mittleren Tumor-pH-Wertes um 0,4-0,7 pH-Einheiten beobachtet (z.B. ASHBY, 1966; JÄHDE et al., 1982; DICKSON und CALDERWOOD, 1983; RHEE et al., 1984; SILVER, 1985). Einige Autoren fanden in einzelnen Tumoren sogar eine Erhöhung der Konzentration der freien Wasserstoffionen gegenüber derjenigen des arteriellen Blutes um den Faktor 100, was einer Absenkung des Tumor-Gewebe-pH-Wertes um 2 pH-Einheiten entspricht (MEYER et al., 1948; INCH, 1954; VAUPEL et al., 1981; THISTLETHWAITE et al., 1984). Im Gegensatz zu diesen Befunden stehen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von REINHOLD, die in

verschiedenen menschlichen Tumoren in situ im Mittel nur einen um 0,1-0,2 pH-Einheiten gegenüber dem arteriellen Blut erniedrigten mittleren Tumor-pH-Wert finden (BERG et al., 1982; WIKE-HOOLEY et al., 1984b). Es stellt sich somit die Frage, inwieweit die in systematischen Untersuchungen an Nagetiertumoren gewonnenen Erkenntnisse auf menschliche Tumoren in vivo übertragbar sind.

Die erwähnten pH-Messungen an menschlichen Tumoren sind als "Fallberichte" zu werten. Falls keine einschneidenden technischen Neuentwicklungen in der experimentellen Onkologie zur Verfügung stehen, werden auch in Zukunft keine systematischen Untersuchungen an menschlichen Tumoren in situ durchführbar sein. Aufgrund dieser Tatsache wurde ein neues Modell entwickelt, das es erlaubt, pH-Verteilungen in menschlichem Tumormaterial systematisch zu untersuchen. Dieses Modell beruht auf der Xenotransplantation menschlichen Tumorgewebes auf T-Lymphozyten-defiziente, daher weitgehend immuntolerante Ratten. Gewebe von menschlichen Mammakarzinomen wurde aufgrund der Häufigkeit dieser Tumoren und der problematischen klinischen Prognose zur Untersuchung verwendet.

Um die in diesen Tumoren gemessenen pH-Verteilungen mit an Nagetiertumoren erhobenen Befunden vergleichen zu können, erfolgte weiterhin die Erfassung von pH-Verteilungen in dem Yoshida-Sarkom, einem in der experimentellen Onkologie häufig verwendeten Nagetiertumor. Zusätzlich wurden pH-Verteilungen in spontan aufgetretenen Rattentumoren erhoben, um zu klären, ob spontan entstandene Tumoren sich in ihrem Mikromilieu grundsätzlich von transplantierten Tumoren unterscheiden. Durch die Anwendung derselben Methode bei diesen vergleichenden Messungen sind methodisch bedingte Unterschiede weitgehend ausgeschlossen.

Vergleichende pH-Untersuchungen sind insbesondere deshalb vordringlich, da das Ausmaß der Tumorzidose wesentliche Konsequenzen sowohl für die Zellproliferation bzw. das Tumorstadium als auch für die Effektivität verschiedener konservativer Therapiemodalitäten hat. Diese Zusammenhänge sind in Tabelle 1 zusammengestellt (eine zusammenfassende Darstellung findet sich auch bei WIKE-HOOLEY et al., 1984a).

Die Tumorzidose verlangsamt die Tumorzellproliferation durch eine Hemmung der DNA-Synthese (ZWARTOW und WESTWOOD, 1958; CECCARINI und EAGLE, 1971; EAGLE, 1973) und der Substrat-Utilisation (WILHELM et al., 1971; MCGOVERN MORONEY et al., 1984). Dabei wird die Zahl sich teilender Zellen durch eine Phasenverschiebung im Zellzyklus reduziert (JETER et al., 1978; TAYLOR und HODSON, 1984). Weiter wurde gezeigt, daß die Tumorzidose die Zahl der sich aus dem Gewebeverband lösenden Zellen erhöhen kann (TURNER, 1979). Ob dies tatsächlich zu einer Erhöhung der Zahl manifester Metastasen führt, ist ungeklärt.

Die Wirksamkeit der Strahlentherapie wird durch die hypoxischen und azidotischen Gewebebezirke im Tumor herabgesetzt (GRAY et al., 1953; GRAY, 1961; RÖTTINGER et al., 1980; RÖTTINGER und MENDONCA, 1982; eine zusammenfassende Darstellung findet sich bei SCHERER, 1981). Hingegen ist die Wirkung der sog. Strahlensensibilisatoren, d.s. Substanzen, welche die Strahlensensibilität erhöhen können, in diesen Gewebebezirken verstärkt (RAJARATNAM et al., 1982). Auch die lokale Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Zytostatika können durch eine Gewebezidose beeinflusst werden, da durch eine Protonierung der Substanzen deren Diffusionseigenschaften verändert werden. So wird einerseits die Wirkung von Bleomycin oder Vincristin durch Hypoxie und Azidose vermindert, während andererseits unter diesen Bedingungen beispielsweise die Wirksamkeit von Doxorubicin verbessert ist

Tabelle 1: Auswirkung einer Gewebeazidose auf Zellstoffwechsel, Zellproliferation und verschiedene Therapiemodalitäten in Tumoren

1. Hemmung der DNA-Synthese
2. Hemmung der Glykolyse
3. Verminderung der Zahl proliferierender Zellen
4. Phasenverschiebung nach G_0 und G_1 im Zellzyklus
5. Verschlechterung der Transplantierbarkeit
6. Erhöhung der Zahl sich aus dem Tumorzellverband ablösender Zellen unter bestimmten Bedingungen
7. Verminderung der Strahlensensibilität der Tumorzellen
8. Veränderung der Wirkung von Strahlensensibilisatoren, d.h. von Substanzen, welche die Strahlenempfindlichkeit der Tumorzellen erhöhen können
9. Änderung der lokalen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Zytostatika (z.B. Verminderung der Wirkung von Adriamycin und Bleomycin, Erhöhung der Wirksamkeit von 5-Fluorouracil und Cisplatin)
10. Steigerung der cytotoxischen Wirkung einer Hyperthermiebehandlung
11. Erhöhung der strahlensensibilisierenden Wirkung der Überwärmungsbehandlung
12. Verzögerung der Thermotoleranzentwicklung bei der Hyperthermiebehandlung

(NISSEN und TANNEBERGER, 1981; HAHN und SHIU, 1983). Auch wird versucht, die lokale Chemotherapeutika-Konzentration im Tumor durch selektive Freigabe der Wirksubstanzen mittels sog. pH-sensitiver Liposomen zu erhöhen (YATVIN et al., 1980; KAYE et al., 1981; ELLENS et al., 1984). Von besonderem Interesse ist jedoch der Einfluß der Tumorzidose auf die Wirkung der Hyperthermiebehandlung, da die Wärmebehandlung die Möglichkeit bietet, die Besonderheiten des Tumormilieus für eine Therapieverstärkung auszunutzen.

Zur Zeit wird Wärme vor allem adjuvant zu den klassischen Therapiemodalitäten eingesetzt. Dabei wird die Hyperthermie entweder als Ganzkörperbehandlung durchgeführt oder lokal mit Hilfe eines Wasserbades, von Mikrowellen oder anderen elektromagnetischen Wellen oder von Ultraschall appliziert. Weiterhin besteht noch die Möglichkeit der isolierten Perfusion von Extremitäten oder von Organen (z.B. der Niere oder der Leber). Wegen der geringeren Komplikationsrate wird heute bevorzugt die lokale Überwärmung eingesetzt (zusammenfassende Darstellungen s. DIETZEL, 1975; SUIT, 1977; HALL, 1978; STREFFER et al., 1978; ARCANGELI und MAURO, 1980; JAIN und GULLINO, 1980; DETHLEFSEN und DEWEY, 1982; HAHN, 1982; NUSSBAUM, 1982; STORM, 1983; HORNBACK, 1984; OVERGAARD, 1985; VAUPEL und KALLINOWSKI, 1985).

Aus den genannten Arbeiten geht eindeutig hervor, daß die Wirksamkeit einer Wärmebehandlung unter Hypoxie- und Azidosebedingungen besonders ausgeprägt ist. Dabei kann die Hyperthermie durch die Beeinflussung von Stoffwechselaktivitäten, der DNA-, der RNA- und der Protein-Synthese sowie von Membranfunktionen bereits in vitro direkt zytotoxisch wirken. Andererseits sind indirekte Wirkungen der Hyperthermie durch die Beeinflussung der Durchblutung maligner Tumoren und des Mikromilieus der Tumorzellen in vivo bekannt. Die Veränderungen des Mikromilieus der Tumorzellen unter Hyperthermie werden vor allem durch Durchblutungsänderungen

hervorgerufen, die sowohl von der Temperatur als auch von der Expositionsdauer abhängen. Geringe Temperaturerhöhungen und/oder kürzere Hyperthermiezeiten können zu einer leichten, transienten Durchblutungssteigerung führen, wohingegen höhere Temperaturen (und sehr lange Expositionszeiten) in der Regel mit einem Abfall der Durchblutung einhergehen. Dieser Durchblutungsabfall zieht eine weitere Verschlechterung der Sauerstoff- und Substratversorgung und eine Verschärfung der Entsorgungsstörungen nach sich. Die nachfolgende Vergrößerung der Hypoxie- und Anoxieareale im Tumorgewebe sollte mit einer Absenkung des Gewebe-pH-Wertes einhergehen. Diese Intensivierung der bereits bestehenden Azidose kann wiederum die nutritive Durchblutung vermindern, die Substrat-Utilisation durch die Tumorzellen verschlechtern und hiermit die Wirkung der Hyperthermiebehandlung verstärken. Damit bietet sich in der Anwendung der Überwärmungsbehandlung die therapeutisch erwünschte Möglichkeit eines sich aufschaukelnden circulus vitiosus, in dem die Hyperthermiewirkung sich selbst verstärkt.

Die Wirksamkeit der Hyperthermiebehandlung vor allem gegen Zellen in hypoxischen und azidotischen Gewebebezirken ist einer der Gründe für die relative Selektivität der Überwärmung. Tumoren werden nämlich durch dieselbe Wärmebehandlung weit mehr geschädigt als Normalgewebe. Darüberhinaus verzögert die Tumorzidose die Entwicklung einer Thermotoleranz, d.h. einer Resistenz der Zellen gegen die Hyperthermiewirkung. Je ausgeprägter daher die Unterschiede des Mikromilieus zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe sind, um so größer ist der Vorteil der Hyperthermieranwendung.

Neben den direkt und indirekt zytotoxischen Wirkungen kann eine Wärmebehandlung noch die Wirksamkeit einer Strahlenbehandlung erhöhen. Diese Wirkungsverstärkung liegt - neben molekularen Mechanismen - wiederum vor allem in dem Mikromilieu maligner Tumoren begründet. Während die Strah-

lenthherapie vor allem Zellen in gut oxygenierten Gewebearealen schädigt (GRAY et al., 1953; GRAY, 1961), sind Zellen in hypoxischen und azidotischen Gewebebezirken weitgehend strahlenresistent. Diese strahlenresistenten Zellen sind jedoch besonders sensibel gegenüber einer Wärmebehandlung.

Schließlich können Temperaturerhöhungen die Empfindlichkeit des Tumorgewebes gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika, z.B. gegenüber Bleomycin, Adriamycin und Cis-Platin steigern (HAHN und SHIU, 1983). Auch kann die Interferonwirkung durch die Hyperthermie gesteigert werden (GROVEMAN et al., 1984).

Da demnach viele der genannten Hyperthermiewirkungen sowohl in vitro als auch in vivo maßgeblich durch den pH-Wert des die Tumorzellen umgebenden Mediums beeinflusst werden, ist für die Effektivität der Hyperthermiebehandlung in vivo nicht nur der pH-Wert im Tumor vor der Hyperthermie, sondern auch die Veränderung dieses Parameters unter und nach der Überwärmung von Interesse. Die bislang zu dieser Frage vorgelegten Ergebnisse sind uneinheitlich. Während die Mehrzahl der Autoren ein Absinken des mittleren pH-Wertes in Nagetiertumoren direkt nach Hyperthermie beobachtet, finden einzelne Arbeitsgruppen keinen pH-Abfall (DICKSON und CALDERWOOD, 1979), oder es wird eine Absenkung nur in vitalem Gewebe beobachtet (VAUPEL, 1982b).

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, eine mögliche Beeinflussung der Gewebeazidose durch eine lokale Wärmebehandlung an isotransplantierten Nagetiertumoren und an xenotransplantierten menschlichen Mammakarzinomen zu untersuchen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tiere und Tumoren

Für die vorliegende Untersuchung fanden drei verschiedene Tumor-Modelle Verwendung.

2.1.1. Isotransplantierte Yoshida-Sarkome bei Sprague-Dawley-Ratten

Zur Untersuchung dienten Sprague-Dawley-Inzucht-Ratten (180 - 560 g) beider Geschlechter. In einem Käfig wurden 2 - 3 Tiere gehalten (Altromin® 1324 Standarddiät für Ratten und Wasser ad libitum). Die Tumoren wuchsen subkutan nach der Injektion von Asziteszellen (0,4 ml; ca. 10^4 Zellen pro Mikroliter) am Fußrücken der rechten Hinterpfote. Ursprünglich stellte das Deutsche Krebsforschungszentrum die verwendete Tumorzell-Linie zur Verfügung, die dann als Aszites in Sprague-Dawley-Ratten (120 - 180 g) weitergeführt werden konnte. Tumoren mit Volumina zwischen 0,5 und 6 ml fanden in der Untersuchung Verwendung (6 - 18 Tage nach der Implantation).

2.1.2. Xenotransplantierte menschliche Mammakarzinome bei T-Lymphozyten-defizienten (rnu/rnu) Ratten

Zur Untersuchung wurden weibliche und kastrierte männliche Nacktratten (120 - 450 g) verwendet. In einem Käfig wurden bis zu 4 Tiere gehalten, denen ein energie- und proteinreiches Futter (Altromin® 1414 tpf) und Wasser ad libitum bis zum Zeitpunkt des Experimentes angeboten wurde. Das Trinkwasser enthielt pro Liter 1,35 g Kaliumsorbat, 2 g Chloramphenicolsuccinat sowie 1/10 Tablette Celasin® (0,3 g Oxytetracyklin) und wurde mit HCl auf einen pH von 2,5 eingestellt (für weitere Details bezüglich der Aufzucht der

Tiere und der Tumorimplantation s. BASTERT et al., 1981; VAUPEL et al., 1985b).

Die Tumorimplantation erfolgte subkutan in die Flanke von im Mittel 60 Tage alten Nacktratten. Die Xenotransplantate eines medullären menschlichen Mammakarzinoms oder eines Plattenepithelkarzinoms der menschlichen Brustdrüse (seriell passagiert in Nacktmäusen in der 36. - 43. Generation) wuchsen innerhalb von 20 - 43 Tagen zu Tumoren heran, die für die Messung herangezogen wurden.

2.1.3. Spontane Dysplasien, benigne und maligne Tumoren der Sprague-Dawley-Ratte

Entlang der Milchleiste von weiblichen und männlichen Sprague-Dawley-Ratten (225 - 640 g) spontan aufgetretene Tumoren wurden im Anschluß an ihre Entdeckung der pH-Messung zugeführt. Die Tiere entstammten den Zuchtstämmen der Höchst AG (Frankfurt/M.) und des Physiologischen Institutes der Universität Mainz.

2.2. Versuchsserien

Insgesamt 229 tumortragende Sprague-Dawley- und Nacktratten sowie 42 tumorfreie Sprague-Dawley-Ratten konnten in die experimentellen Untersuchungen einbezogen werden. Die durchgeführten Versuchsserien sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

2.2.1. Tumortragende Tiere

Die Versuchstiere mit Yoshida-Sarkomen wurden in folgende Gruppen eingeteilt: in eine Gruppe, bei welcher die Tumor-Gewebe-pH-Werte ohne vorherige Behandlung gemessen wur-

Tabelle 2: Zusammenstellung von Kenngrößen der angeführten Versuchsserien

Serien-Nr.	Kennzeichnung	Tierzahl	Rattenstamm	Gewebe	Meßbedingungen
1	SD MM NT	12	Sprague-Dawley	Skelettmuskulatur	Normothermie
2	SD SC NT	10	Sprague-Dawley	Subkutis	
3	NR SC NT	21	rnu/rnu	Subkutis	
4	SD Yosh NT	30	Sprague-Dawley	Yoshida-Sarkom	
5	NR MED NT	36	rnu/rnu	menschl. Mammaca., medullär	
6	NR ANA NT	24	rnu/rnu	Plattenepithelca. der menschl. Brustdrüse	
7	SD Spontan NT	18	Sprague-Dawley	Mammatu. der Ratte, spontan	
8	SD SC HT	10	Sprague-Dawley	Subkutis	1 Stunde nach Ultraschall- hyperthermie (44°C, 60 min)
9	SD Yosh HT	46	Sprague-Dawley	Yoshida-Sarkom	
10	NR MED HT	32	rnu/rnu	menschl. Mammaca., medullär	
11	NR ANA HT	13	rnu/rnu	Plattenepithelca. der menschl. Brustdrüse	
12	SD SC HNT	10	Sprague-Dawley	Subkutis	1 Tag nach Ultraschall- hyperthermie (44°C, 60 min)
13	SD Yosh HNT	30	Sprague-Dawley	Yoshida-Sarkom	

den (Kennzeichnung: SD Yosh NT/ 30 Tiere), in eine Gruppe, die zur Messung der pH-Verteilung im Tumorgewebe sofort im Anschluß an die Überwärmung des Tumors diente (Latenzzeit: 10 - 30 min; Kennzeichnung: SD Yosh HT/ 46 Tiere) und in eine Gruppe, bei der 24 - 28 Stunden nach der Überwärmung Gewebe-pH-Werte im Tumor bestimmt wurden (Kennzeichnung: SD Yosh HNT/ 30 Tiere).

Bei diesen drei Gruppen erfolgte eine Einteilung der Tumoren in Gewichtsklassen, wobei als wesentlichstes Kriterium für die Einteilung die Ausprägung makroskopisch sichtbarer Nekroseareale diente.

Alle verwendeten Nacktratten trugen Tumoren. Insgesamt wurden 105 xenotransplantierte menschliche Mammakarzinome von zwei Zelllinien (68 medulläre Karzinome, 37 Plattenepithelkarzinome) auf ebensovielen Trägartieren in die Untersuchung einbezogen. 36 medulläre Tumoren und 24 Plattenepithelkarzinome dienten zur Messung der Gewebe-pH-Werte ohne vorherige Behandlung (Kennzeichnung: NR MED bzw. ANA NT), wohingegen bei 32 medullären Tumoren und 13 Plattenepithelkarzinomen die pH-Verteilung direkt im Anschluß an die lokale Überwärmung des Tumors (44°C, 60 min) erfaßt wurde (Kennzeichnung: NR MED bzw. ANA HT). Die Tumoren wurden entsprechend der bei den Yoshida-Sarkomen vorgenommenen Einteilung nach ihren Gewichten klassifiziert.

18 Sprague-Dawley-Ratten mit spontan aufgetretenen Tumoren konnten während des Untersuchungszeitraumes zur Messung der pH-Verteilung in den Tumoren verwendet werden (Kennzeichnung: SD Spontan NT).

Bei einem Teil der verwendeten Nacktratten konnten im Anschluß an die pH-Messung im Tumor zusätzlich pH-Werte in der Subkutis der Bauchhaut gemessen werden (Kennzeichnung: NR SC NT/ 21 Tiere).

2.2.2. Kontrollen (tumorfreie Tiere)

Bei den tumorfreien Sprague-Dawley-Ratten wurde entweder der pH-Wert in der Oberschenkelmuskulatur (Kennzeichnung: SD MM NT/ 12 Tiere) oder am Implantationsort des Tumors (d.h. in der Subkutis der rechten Hinterpfote) gemessen (Kennzeichnung: SD SC/ 30 Tiere). Dabei war bei letzteren 30 Tieren die rechte Hinterpfote jeweils der gleichen Behandlung unterzogen wie bei den Tumortieren: bei einem Drittel wurde der pH-Wert in der Subkutis der rechten Hinterpfote ohne vorherige Behandlung erfaßt (Kennzeichnung: SD SC NT/10 Tiere), bei einem weiteren Drittel sofort im Anschluß an die Überwärmung (44°C, 60 min; Kennzeichnung: SD SC HT/ 10 Tiere) und bei dem letzten Drittel 24 - 28 Stunden nach der Überwärmung (Kennzeichnung: SD SC HNT/ 10 Tiere).

2.3. Versuchsdurchführung

2.3.1. Vorbereitung und Überwachung der Tiere während des Experimentes

Zur Narkose fand Na- Pentobarbital (35 - 40 mg/kg ip, Nembutal[®], Ceva, Paris, Frankreich), als Antikoagulans Heparin (Thrombophob[®], 350 - 400 USP-Einheiten/kg) Verwendung. Bei Bedarf wurden kleine Mengen Nembutal[®] bzw. Heparin nachinjiziert. Am Tag der pH-Messung wurde die linke A. carotis der Versuchstiere mit einem PVC-Katheter kanüliert, der die kontinuierliche Kontrolle des mittleren arteriellen Blutdruckes MABP (Statham Druckwandler, Typ P 23 Db; Gould Druckanzeiger, Typ SP 1400) und die Aufzeichnung auf einem Mehrkanalschreiber (Typ LS 64, LS 23, Linseis GmbH, Selb) sowohl während der Hyperthermie (sofern an diesem Tag durchgeführt) als auch während der pH-Messungen ermöglichte. Bei der Wärmebehandlung ohne Kontrolle des arteriellen Blutdruckes der Tiere (SD Yosh HNT, SD SC HNT) diente die Beurtei-

lung der Haut- und Schleimhautdurchblutung als grobes Maß für die Einschätzung des Kreislaufzustandes der Tiere.

Die wiederholte anaerobe Entnahme arterieller Blutproben vor und nach der Überwärmung sowie mehrfach während der pH-Messung erlaubte die Bestimmung relevanter Parameter des Atemgaswechsels (O_2 - und CO_2 -Partialdruck, Blut-pH-Wert) mit Hilfe eines Blutgasanalysators (Typ MT 33, Combi-Analysator, L.Eschweiler & Co., Kiel). Zusätzlich wurde der Hämatokritwert mit der Mikromethode nach HAWKSLEY ermittelt. Aus diesen Werten wurde die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins S_{O_2} nomographisch bestimmt (BORK et al., 1975). Die arterielle Glukosekonzentration konnte bei einigen Sprague-Dawley- und bei den verwendeten Nacktratten enzymatisch gemessen werden (Gluco-quant® Glucose Testkombination, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim). Blutverluste durch die Probennahmen wurden über den Katheter in der A. carotis adäquat durch Frischblut ersetzt.

Die Rektaltemperatur der während der Versuche auf einem thermostatisierten Operationsbett liegenden Tiere ist mehrfach während aller Experimente kontrolliert worden.

Die Tiere wurden zu Beginn des Experimentes mit Klebeband in der gewünschten Position auf dem Wärmebett fixiert. Dabei wurde bei den Yoshida-Sarkom-Ratten darauf geachtet, daß die Blutzirkulation in der rechten Hinterpfote nicht gestört wurde. Tiere mit xenotransplantierten Mammakarzinomen und mit Spontantumoren wurden so gelagert, daß die Tumoren keinen Zug oder Druck auf das umgebende Gewebe ausüben konnten.

Um Volumenzunahmen der Pfoten unter der Hyperthermie quantitativ beurteilen zu können, wurde bei den Sprague-Dawley-Ratten das Gewicht der tumorfreien und der tumortragenden Pfote vor und nach der Wärmebehandlung als Gewicht

des verdrängten Wassers (Auftrieb) beim Eintauchen der Pfote in ein mit Wasser gefülltes Gefäß bestimmt, wobei letzteres auf einer Präzisionswaage (Typ PL 1200, Fa.Mettler) stand. Hierbei wurde das spezifische Gewicht sowohl von Tumor- als auch von Normalgewebe vereinfachend mit 1 g/ml angenommen.

Am Versuchsende wurden alle Tumoren exzidiert, gewogen und mit histologischen Standardtechniken untersucht. Die routinemäßige histologische Aufarbeitung hatte zum Ziel, etwaige Veränderungen morphologischer Eigenschaften der Tumoren während des Untersuchungszeitraumes weitgehend ausschließen zu können. Weiterhin erfolgte anhand der histologischen Präparate die Klassifizierung der Spontantumoren nach KOMITOWSKI et al. (1982) unter Einbeziehung der Klassifizierung von YOUNG und HALLOWES (1973) (analog der standardisierten Klassifizierung von Spontantumoren des Hundes und der Katze nach HAMPE und MISDORF, 1974).

2.3.2. Überwärmung der Gewebe und Kontrolle der Gewebetemperatur

Der Versuchsaufbau für die Überwärmung von xenotransplantierten menschlichen Mammakarzinomen ist in Abb.1 schematisch dargestellt.

Für die Hyperthermiebehandlung fand das von LIERKE et al. (1982) entwickelte Feedback-Kontroll-System für lokalisierte Hyperthermie (Ultraschall 1,7 MHz; Bericht über erste Anwendungen s. MÜLLER-KLIESER et al., 1982) Verwendung. Die rechte Hinterpfote von 20 Sprague-Dawley-Ratten und 36 Yoshida-Sarkom-Ratten wurden mit Aufheizraten von $\Delta T/\Delta t > 1,5^\circ\text{C}/\text{min}$ erwärmt. Die Hyperthermietemperatur von 44°C konnte mit einer Leistung von 2 - 3 Watt (akustische Leistung) innerhalb von 5 - 10 Minuten, bzw. 2 - 3 Minuten erreicht werden. Die Gewebe wurden für 60 Minuten bei dieser Temperatur gehalten.

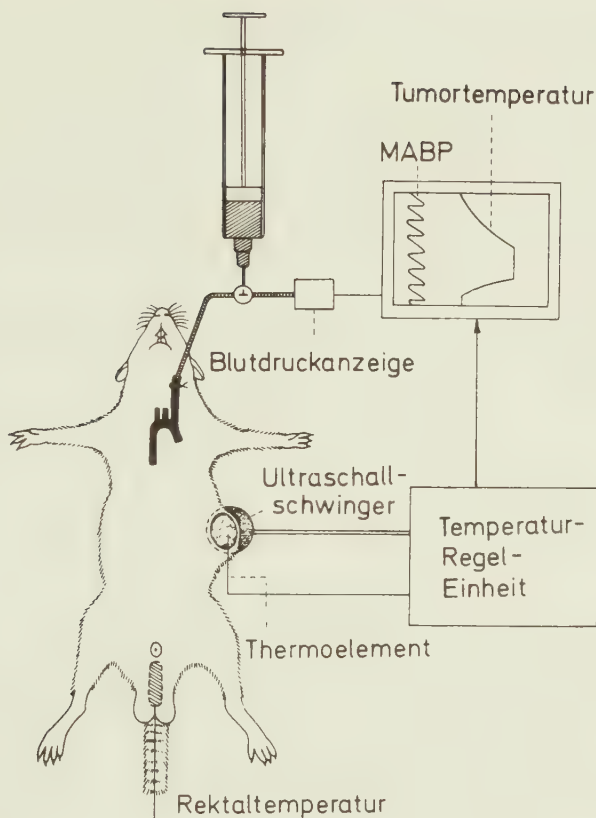


Abb.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues zur Überwärmung von menschlichen Mammakarzinomen, die in die Subkutis von rnu/rnu-Ratten xenotransplantiert sind (MABP = mittlerer arterieller Blutdruck)

Der Einfluß der Dosisrate auf den Gewebe-pH-Wert wurde an 10 Yoshida-Sarkomen mit Tumorfeuchtgewichten um 2,2 g überprüft. Diese Tumoren wurden mit Aufheizraten $\Delta T/\Delta t < 0,7^\circ\text{C}/\text{min}$ erwärmt, was zu einer Halbierung der zum Aufheizen einzustrahlenden Leistung und zu einer Verfünffachung der Aufheizzeit führte. Auch diese Tumoren wurden nach dem Erreichen von 44°C für 60 Minuten auf dieser Temperatur gehalten.

Da bei der geringeren Dosisrate eine stärkere pH-Absenkung erfolgte, wurden die in der Folgezeit überwärmten Xenotransplantate menschlicher Mammakarzinome mit Aufheizraten unter $0,7^\circ\text{C}/\text{min}$ erwärmt, um die größtmögliche Hyperthermiewirkung zu erzielen. Auch bei diesen Tumoren wurde die angestrebte Tumortemperatur von 44°C nach dem Erreichen für 60 Minuten beibehalten.

Die Messung der Tumortemperatur erfolgte mit Hilfe von miniaturisierten Thermoelementen (Schaftdurchmesser: $250\ \mu\text{m}$, Typ 2ABAC 025/1BT 1, Philips GmbH, Kassel). Diese waren entweder mit einem elektronisch kontrollierten Thermostaten mit einer konstanten Referenztemperatur (Transostat, Philips GmbH, Kassel) oder mit einem Eiswasserbad verbunden. Die Aufzeichnung der Tumortemperatur zusammen mit der Regelleistung und ggf. mit dem mittleren arteriellen Blutdruck erfolgte auf einem Mehrkanalschreiber (Typ LS 64, Linseis GmbH, Selb).

Bei allen Experimenten wurde ein Thermoelement so in das Gewebe eingestochen, daß die Spitze im Tumorzentrum zu liegen kam. Nach dem Einstich erfolgte die Fixierung des Thermoelementes an dem Fuß bzw. an der Flanke und dem Schwanz der Ratte mit Klebeband. Die Position des Thermoelementes wurde mehrfach während der Überwärmung überprüft.

Zur Kalibrierung der Gewebetemperaturmessung vor und

nach der Hyperthermie dienten ein Präzisionsthermometer und Wasserbäder verschiedener Temperatur. Während der Kalibrierung konnten die Gewebe durch Bestrahlung mit einer Operationslampe auf einer einheitlichen Temperatur von 33 - 34°C gehalten werden. Um mögliche Beeinflussungen der GewebepH-Messung durch erhöhte Gewebetemperaturen zu vermeiden, wurde nach der Wärmebehandlung solange gewartet, bis die Gewebetemperatur auf physiologische Werte abgefallen war. Bei der Lagerung der Tiere für die Hyperthermiebehandlung wurde darauf geachtet, daß die Tumoren möglichst gut zentriert waren.

2.3.3. Messung des Gewebe-pH-Wertes

Der Versuchsaufbau zur pH-Messung in subkutanen xenotransplantierten menschlichen Mammakarzinomen ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Als Meßelektroden dienten miniaturisierte, stahlummantelte Nadel-Glas-pH-Elektroden (Typ Mi 408 B, Microelectrodes Inc., Londonderry, USA) mit einem Durchmesser der pH-sensitiven Meßfläche von 650 µm. Als Referenzelektrode fand eine Makro-pH-Referenzelektrode (Typ 303, Dr. W. Ingold KG, Frankfurt/Main) Verwendung. Die Meßelektroden wurden mit Hilfe von Mikromanipulatoren (Typ MM5m mit Magnetstativ und Steuergerät STM3, Gebr. Märzhäuser oHG, Wetzlar) vorgeschoben. Die Referenzelektrode war an einem üblichen Laborstativ befestigt.

Die Meßsignale konnten mit einem Zwei-Kanal-Multimeter (Typ 619, Keithley Instruments, Cleveland, USA) abgeleitet und auf einem Zwei-Kanal-Schreiber (Typ LS 23, Linseis GmbH, Selb) aufgezeichnet werden. Die Kalibrierung der Elektroden erfolgte vor und nach jedem Experiment in mehreren, auf 34°C thermostatisierten Eichpufferlösungen (Pufferlösung pH 4,01

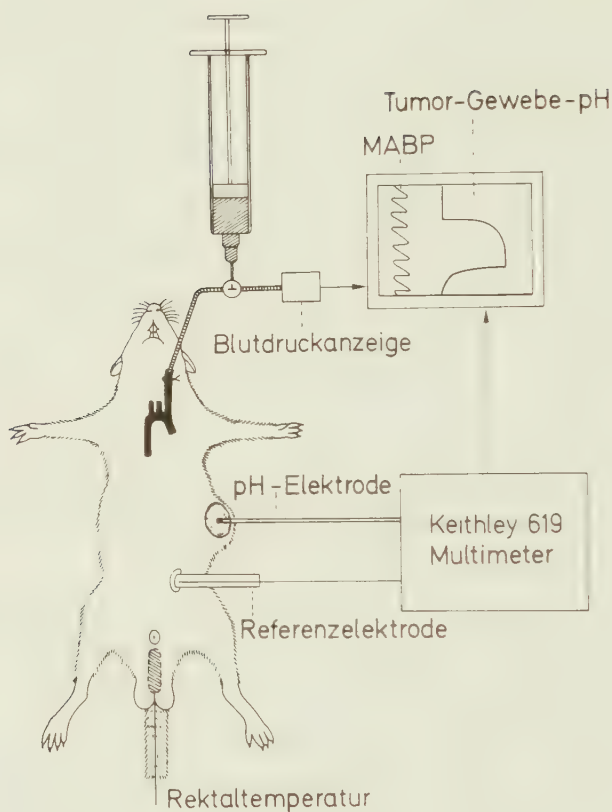


Abb.2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues zur Messung des Gewebe-pH-Wertes in menschlichen Mammakarzinomen, die in die Subkutis von rnu/rnu-Ratten xenotransplantiert sind
(MABP = mittlerer arterieller Blutdruck)

und 6,87 sowie 9,18; Schott GmbH, Hofheim). Zwischen den Versuchstagen wurden die Meßelektroden in 5%iger Proteaselösung aufbewahrt, um eventuelle Proteinverklebungen zu beseitigen.

Die subkutanen Yoshida-Sarkome konnten mit 2 Elektroden gleichzeitig vermessen werden, wobei jeweils Stichkanäle von bis zu 11 mm Tiefe erfaßt wurden. Nach Schritten von jeweils 250 - 500 µm wurde der Vorschub gestoppt und ein konstanter Meßwert abgewartet. In einzelnen Versuchen wurden die Elektroden in einer Tiefe von ca. 5 mm bis zu einer Stunde belassen, um zeitabhängige Veränderungen des Gewebe-pH-Wertes zu erfassen.

Der Einstich der beiden Meßelektroden erfolgte konzentrisch in einem Abstand von 0,5 - 1 cm. Eine mechanische Alteration der Elektroden durch die Metatarsalknochen wurde vermieden.

Da die xenotransplantierten menschlichen Mammarkarzinome in der sehr lockeren Subkutis der Nacktratten außerordentlich verschieblich waren, wurde lediglich eine Elektrode eingestochen, um eine mechanische Beeinflussung der Messung möglichst gering zu halten.

Die hohe mechanische Festigkeit bei einigen der untersuchten Spontan Tumoren verhinderte einen regelrechten Vorschub der Elektrode mit einem Mikromanipulator. Daher wurde bei diesen Tumoren eine Elektrode per Hand eingestochen und vorgeschoben. Eine lokalisationsbezogene Auswertung der pH-Verteilungen konnte bei diesen Tumoren somit nicht durchgeführt werden.

Für die pH-Messungen im Tumorgewebe wurde zunächst die Haut über dem Tumor auf einer Strecke von 1 - 2 mm mit einem Skalpell gespalten. Anschließend konnten die Meßelektroden

in das Tumorgewebe vorgeschoben werden, ohne auf das Gewebe Druck auszuüben. Die Einstichöffnungen waren während der Messungen mit 34°C warmer physiologischer Kochsalzlösung überschichtet.

Für die Muskelmessungen wurde die Faszie über der Oberschenkelmuskulatur des Tieres vorsichtig stumpf gespalten. Danach wurden die Meßelektroden in die Muskulatur eingeschoben. Zuvor war die Haut des Tieres an der entsprechenden Stelle inzidiert worden. Auch diese Einstichöffnungen wurden mit thermostatisierter physiologischer Kochsalzlösung überschichtet.

Für die Messungen in der Subkutis des unbehandelten und des überwärmten Fußes wurde die Fußrückenhaut 1 - 2 mm weit eröffnet; durch diesen Schnitt wurde die Elektrode in das lockere Unterhautgewebe vorgeschoben, nachdem auch diese Einstichöffnung mit 34°C warmer physiologischer Kochsalzlösung überschichtet worden war.

Die Referenzelektrode wurde in eine subkutane, mit körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung gefüllte Tasche eingesetzt.

Bei der Gewebe-pH-Messung im Zusammenhang mit der Hyperthermiebehandlung wurde mit den Stichelektroden die unmittelbare Nachbarschaft des Thermoelementes gemieden. Die pH-Messung selbst erfolgte im Innern eines Faraday-Käfigs.

2.4. Statistische Methoden

Aus den Einzelwerten der Gewebe-pH-Messungen wurden (wie international üblich) Histogramme (Häufigkeitsverteilungen) mit einer Klassenbreite von 0,1 pH-Einheiten für die einzelnen Versuchsserien konstruiert. Für die Yoshida-Sarkome, bei

denen ein konzentrischer Einstich erfolgt war, wurden die Meßwerte des äußeren Drittels eines jeden Stichkanals (Einstichtiefe: 0,5 - 3,5 mm), des mittleren Drittels (Einstichtiefe: 4 - 7 mm) und des inneren Drittels (Einstichtiefe: 7,5 - 10,5 mm) zu Histogrammen zusammengefaßt.

Mit Hilfe eines Taschenrechners (Typ TI Programmable 59, Solid State Software, Texas Instruments Inc.) und eines Apple II Tischrechners erfolgte weiterhin die Bestimmung des Mittelwertes, des Medianwertes, der Modalklasse, der Standardabweichung des Mittelwertes und der Standardabweichung der Einzelwerte als Variabilitätsmaße. Die Breite der Modal-klasse wurde dabei in Anlehnung an die Klassenbreite der Histogramme auf 0,1 pH-Einheiten festgelegt.

Zur Wertung der gefundenen Unterschiede wurden je nach Problemstellung verschiedene nichtparametrische Tests angewandt. Verwendung fanden der Wilcoxon-Test für verbundene und unverbundene Stichproben, der Kruskal-Wallis-Test und der Friedman-Test, wobei für die Berechnung die Mediane der Beobachtungseinheiten zugrundegelegt wurden. Als Beobachtungseinheiten dienten die untersuchten Tumoren.

Die zeitlichen Veränderungen systemischer Parameter des tumortragenden Tieres in Zusammenhang mit der Hyperthermiebehandlung wurden in Form von sog. Box- und Whisker-Plots dargestellt (zur näheren Erläuterung eines Box- und Whisker-Plots s. Abb. 3).

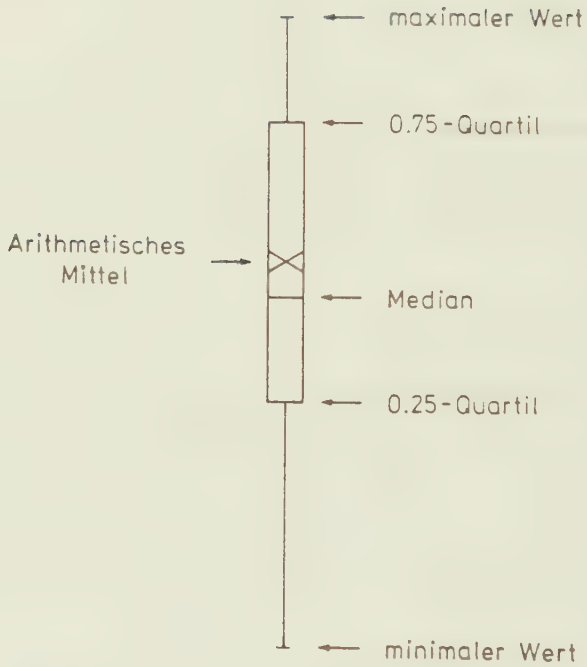


Abb.3: Erläuternde Darstellung eines Box- und Whisker-Plots

3. ERGEBNISSE

3.1. Gewebe-pH-Verteilungen unter Normothermie

3.1.1. Muskel und Subkutis

Die relevanten statistischen Parameter der pH-Verteilungen in der Skelettmuskulatur und in subkutanem Gewebe unter Normothermie sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Die pH-Verteilung in der Oberschenkelmuskulatur der Sprague-Dawley-Ratte ist in Abb.4 dargestellt. Man erkennt eine angenäherte Normalverteilung um einen Mittelwert von 7,26 (Standardabweichung: $\pm 0,12$; Median: 7,26; Modalklasse: 7,20 - 7,29). Die pH-Werte verteilen sich zwischen 6,77 und 7,54.

In der Subkutis der rechten Hinterpfote der Sprague-Dawley-Ratte beträgt der mittlere pH-Wert $7,32 \pm 0,12$ (Median: 7,32; Modalklasse: 7,30 - 7,39; pH-Bereich: 7,05 - 7,59). Die Häufigkeitsverteilung der in der Subkutis der Bauchwand von Nacktratten gemessenen pH-Werte ist in Abb.5 gezeigt. Eine rechtsschiefe Verteilung mit einem Medianwert von 7,28 ist erkennbar (Mittelwert: $7,26 \pm 0,16$; Modalklasse: 7,30 - 7,39; pH-Bereich: 6,97 - 7,95).

3.1.2. Tumoren

Die relevanten statistischen Parameter der pH-Verteilungen in den bei Normothermie untersuchten Tumorgeweben sind in Tabelle 4 aufgeführt. Abbildung 6 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der pH-Verteilungen in isotransplantierten Yoshida-Sarkomen, in Xenotransplantaten eines medullären menschlichen Mammakarzinoms, in Xenotransplantaten eines Plattenepithelkarzinoms der menschlichen Brustdrüse und in

Tabelle 3:

Statistische Parameter der pH-Verteilungen in der Oberschenkelmuskulatur (SD MM NT) und in der Subkutis des Fußrückens (SD SC NT) von Sprague-Dawley-Ratten und in der Subkutis der Bauchhaut von (rmu/rnu)-Ratten (NR SC NT) bei Normothermie ($T = 34^{\circ}\text{C}$; $N = \text{Anzahl der Tiere}$, $n = \text{Anzahl der Meßwerte}$, $\overline{\text{pH}} = \text{mittlerer Gewebe-pH-Wert}$, $s_x = \text{Standardabweichung der pH-Werte}$)

	N	n	$\overline{\text{pH}}$	s_x	Median	Modalklasse	pH-Bereich
SD MM NT	12	72	7,26	0,12	7,26	7,20 - 7,29	6,77 - 7,54
SD SC NT	10	20	7,32	0,12	7,32	7,30 - 7,39	7,05 - 7,59
NR SC NT	21	82	7,26	0,16	7,28	7,30 - 7,39	6,97 - 7,95

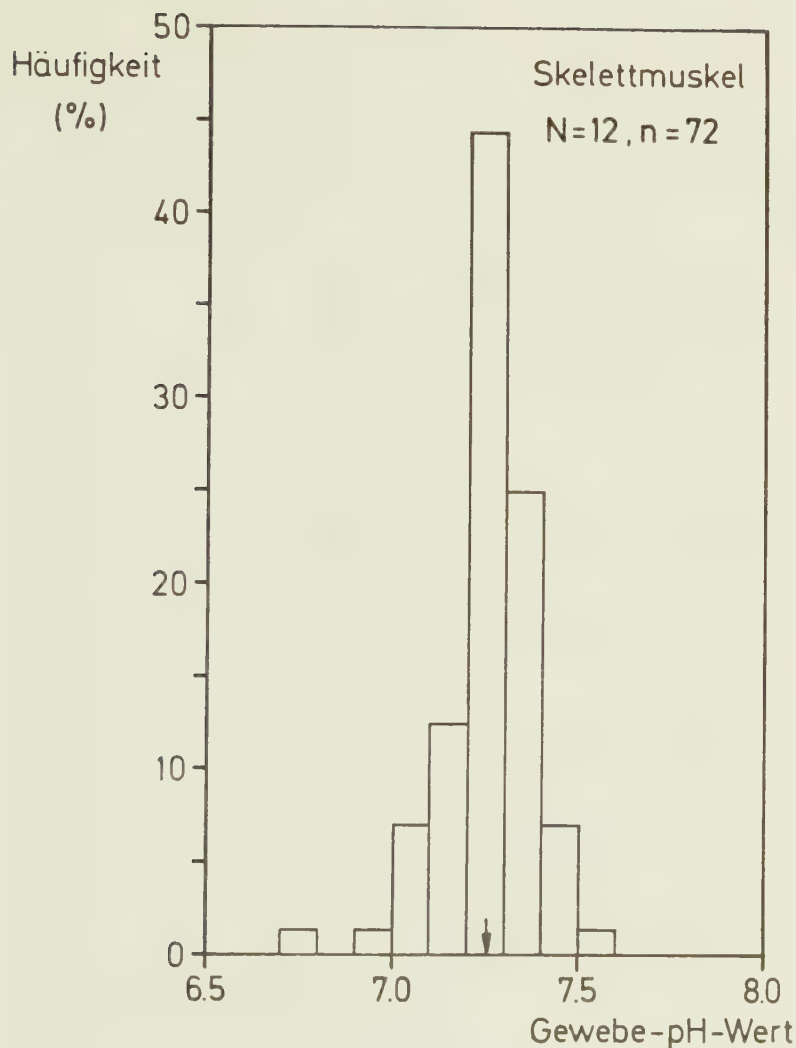


Abb.4: Häufigkeitsverteilung der in der Oberschenkelmuskulatur von Sprague-Dawley-Ratten gemessenen pH-Werte. Der Pfeil bezeichnet den Mittelwert (N = Anzahl der untersuchten Tiere, n = Anzahl der Meßwerte)

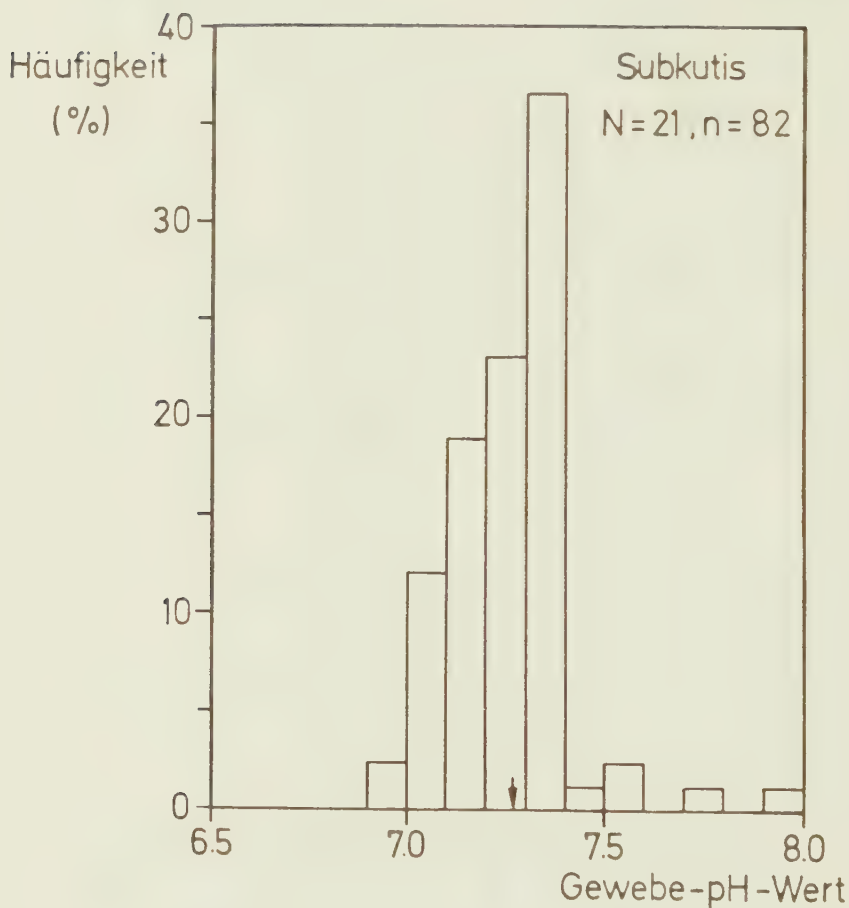


Abb.5: Histogramm der in der Subkutis der Bauchhaut von rnu/rnu-Ratten gemessenen pH-Werte. Der Pfeil bezeichnet den Medianwert (N = Anzahl der untersuchten Tiere, n = Anzahl der Meßwerte)

Tabelle 4: Statistische Parameter der pH-Verteilungen in isotransplantierten Yoshida-Sarkomen (SD Yosh NT), in xenotransplantierten medullären menschlichen Mammakarzinomen (NR MED NT), in xenotransplantierten Plattenepithelkarzinomen der menschlichen Brustdrüse (NR ANA NT) und in spontanen Brusttumoren der Sprague-Dawley-Ratte (SD Spontan NT) während Normothermie ($T = 34^{\circ}\text{C}$; tww = mittleres Tumorflechtgewicht, N = Anzahl der Tiere, n = Anzahl der Meßwerte, $\overline{\text{pH}}$ = mittlerer Gewebe-pH-Wert, s_x = Standardabweichung der gemessenen pH-Werte)

	N	n	$\overline{\text{pH}}$	s_x	Median	Modalklasse	pH-Bereich
SD Yosh NT							
gesamt	30	1336	6,87	0,21	6,87	6,90 - 6,99	6,41 - 7,78
tww = 1,5 g	10	448	6,85	0,17	6,85	6,80 - 6,89	6,49 - 7,31
tww = 2,4 g	10	440	6,89	0,24	6,90	6,90 - 6,99	6,46 - 7,77
tww = 4,0 g	10	448	6,86	0,21	6,85	6,90 - 6,99	6,41 - 7,78
NR MED NT							
gesamt	36	2633	6,81	0,25	6,82	6,80 - 6,89	5,78 - 7,59
tww = 1,9 g	13	912	6,79	0,24	6,79	6,80 - 6,89	6,14 - 7,49
tww = 4,2 g	11	876	6,83	0,22	6,82	6,80 - 6,89	6,10 - 7,44
tww = 8,1 g	12	845	6,80	0,27	6,87	6,90 - 6,99	5,78 - 7,59
NR ANA NT							
gesamt	24	1580	7,04	0,19	7,03	7,00 - 7,09	6,51 - 7,62
tww = 1,6 g	13	763	6,98	0,19	6,97	6,90 - 6,99	6,51 - 7,56
tww = 4,2 g	11	817	7,10	0,18	7,11	7,10 - 7,19	6,58 - 7,62
SD Spontan NT							
Dysplasien	4	197	7,05	0,20	7,10	7,10 - 7,19	6,61 - 7,42
benigne	9	535	6,92	0,21	6,87	6,80 - 6,89	6,00 - 7,72
maligne	5	316	6,94	0,19	6,94	6,90 - 6,99	6,62 - 7,38

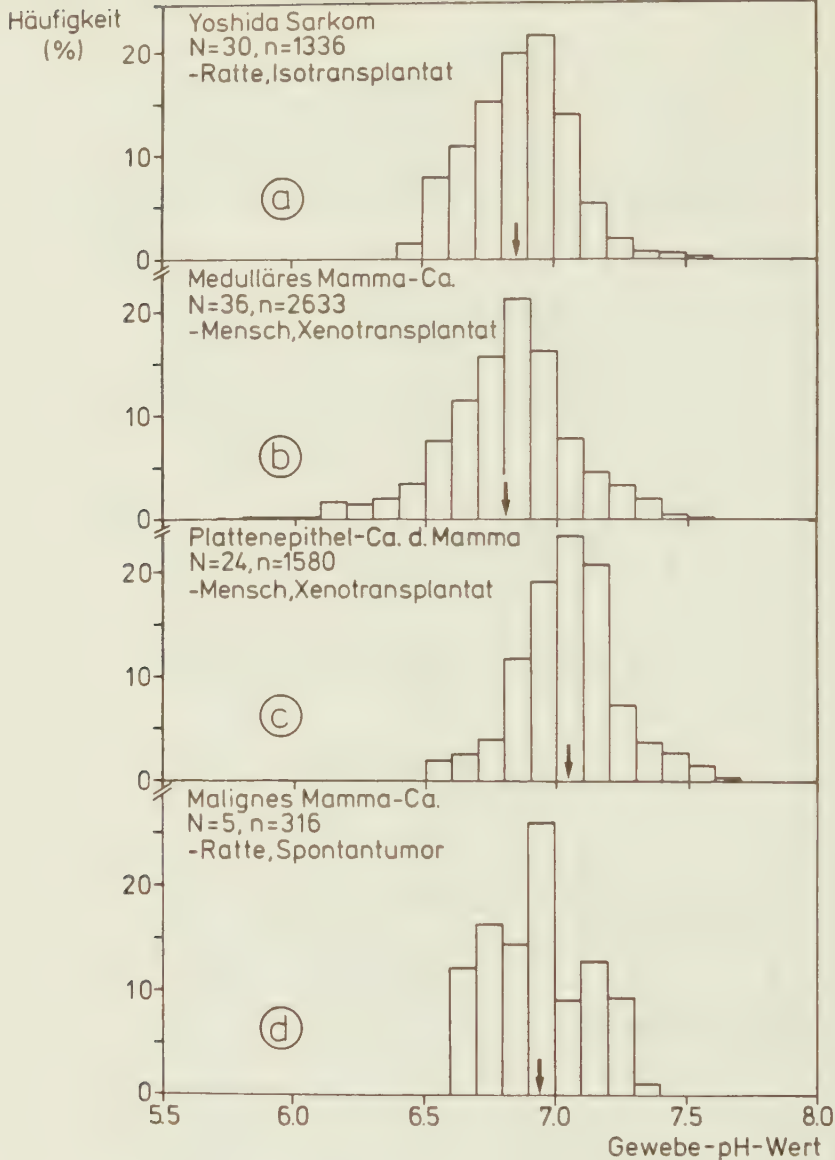


Abb.6: Häufigkeitsverteilungen der pH-Werte in isotransplantierten Yoshida-Sarkomen (a), in xenotransplantierten medullären menschlichen Mammakarzinomen (b), in xenotransplantierten Plattenepithelkarzinomen der menschlichen Brustdrüse (c) und in spontanen malignen Brusttumoren der Sprague-Dawley-Ratte (d) bei Normothermie ($T = 34^{\circ}\text{C}$). Die Pfeile kennzeichnen die jeweiligen mittleren pH-Werte (N = Anzahl der untersuchten Tumoren, n = Anzahl der Meßwerte)

spontanen malignen Brusttumoren der Sprague-Dawley-Ratte. Es ist offensichtlich, daß die pH-Verteilungen in allen untersuchten malignen Tumoren im Vergleich zu den Verteilungen in der Skelettmuskulatur und in der Subkutis deutlich nach links, d.h. zu niedrigeren Werten, verschoben sind.

Die pH-Werte in den untersuchten Yoshida-Sarkomen sind um einen Mittelwert von $6,87 \pm 0,21$ normal verteilt (Abb.6a). Bei einer Zunahme des mittleren Tumorfeuchtgewichtes von $1,5 \pm 0,4$ g auf $4,0 \pm 0,7$ g ändert sich die pH-Verteilung nur geringfügig (s.Abb.7). Bei etwa gleichbleibendem mittlerem und medianem pH-Wert verschiebt sich die Modalklasse von 6,80 - 6,89 nach 6,90 - 6,99, der Anteil der pH-Werte oberhalb 7,1 nimmt von 6% auf 10% zu. Diese Veränderungen sind jedoch statistisch unauffällig. Auch die medianen pH-Werte einzelner Tumoren unterschiedlicher Größe ändern sich nicht (Abb.8).

Bei den untersuchten Xenotransplantaten des medullären Mammakarzinoms liegt ebenfalls eine Normalverteilung der gemessenen pH-Werte vor (mittlerer pH-Wert: $6,81 \pm 0,25$; s. Abb.6b). Hier wird die Verteilung mit zunehmendem mittlerem Tumorgewicht von $1,9 \pm 0,6$ g auf $8,1 \pm 1,6$ g breiter und rechtsschief (s.Abb.9). Die Modalklasse verschiebt sich von 6,80 - 6,89 (Median: 6,79) bei den kleineren Tumoren nach 6,90 - 6,99 (Median: 6,87) bei den schwereren Tumoren. Der Anteil der pH-Werte oberhalb pH 7,0 nimmt von 9% auf 23% zu. Auch diese Veränderungen sind statistisch unauffällig. Bei der Betrachtung der medianen pH-Werte einzelner medullärer Karzinome hingegen läßt sich als Trend eine Abnahme der pH-Werte bis zu Feuchtgewichten von 7 g erkennen, die von einer Zunahme der pH-Werte bei höheren Feuchtgewichten gefolgt ist (Abb.10).

Im Vergleich zu den Yoshida-Sarkomen und den medullären Mammakarzinomen ist die pH-Verteilung in dem untersuchten

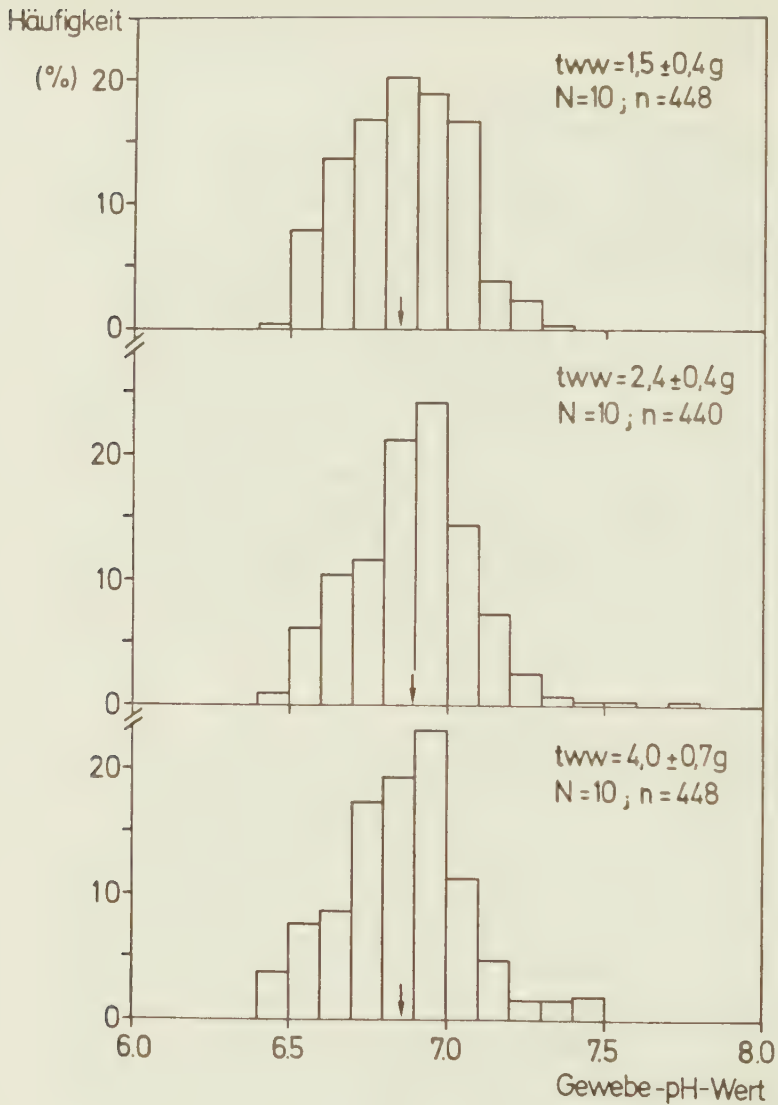


Abb.7: pH-Histogramme in isotransplantierten Yoshida-Sarkomen unterschiedlichen Feuchtgewichtes (tww) bei Normothermie ($T = 34^{\circ}C$). Die Pfeile kennzeichnen die mittleren pH-Werte (N = Anzahl der untersuchten Tumoren, n = Anzahl der Meßwerte)

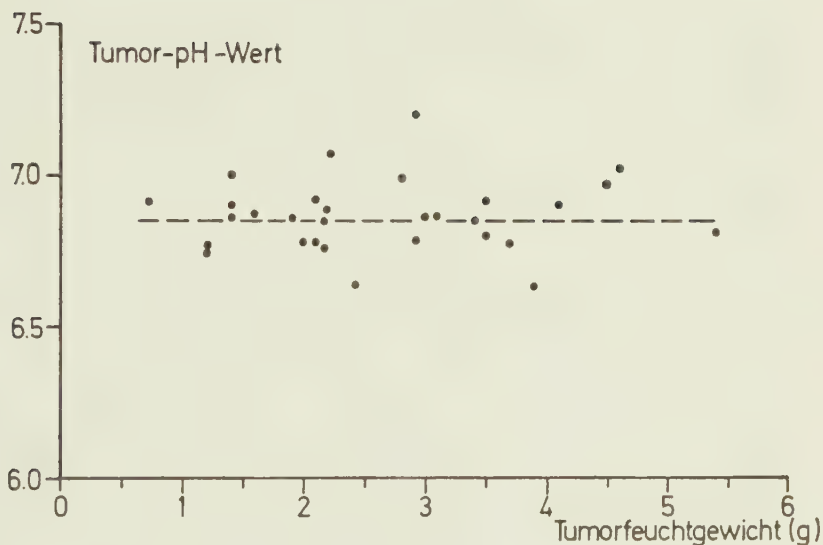


Abb.8: Mediane pH-Werte in 30 isotransplantierten Yoshida-Sarkomen unterschiedlichen Feuchtgewichtes bei Normothermie ($T = 34^{\circ}\text{C}$). Die gestrichelte Kurve soll den Trend verdeutlichen.

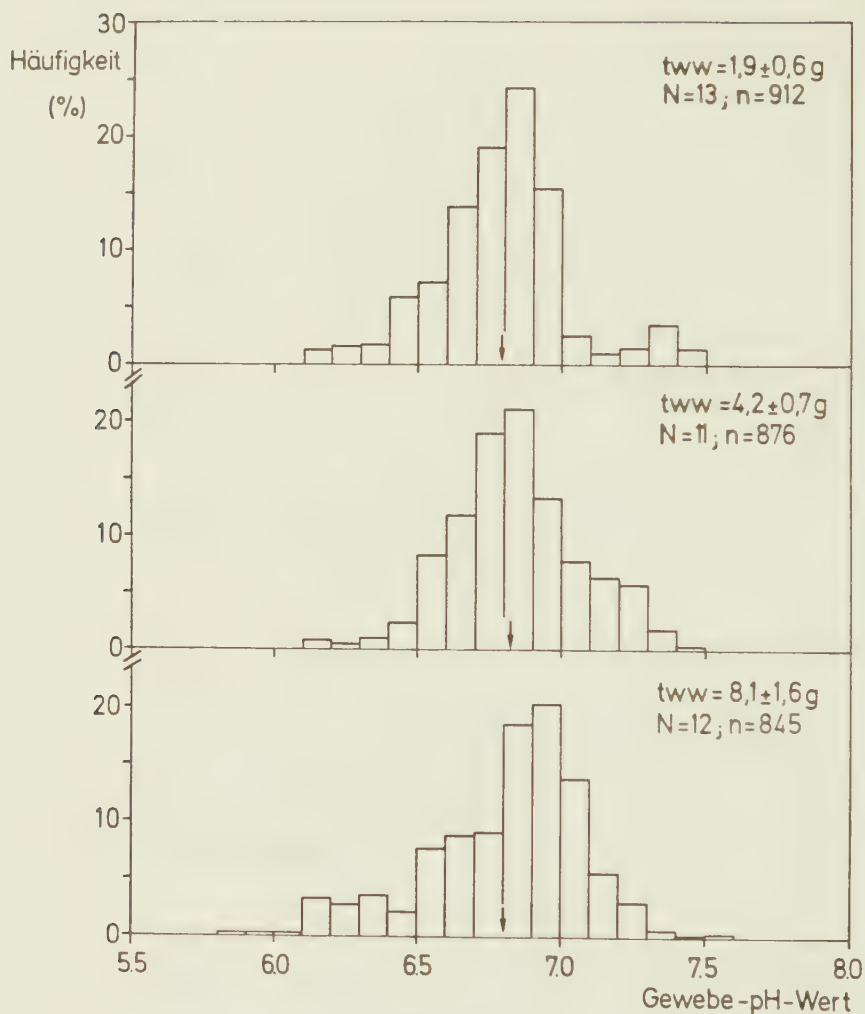


Abb.9: pH-Häufigkeitsverteilungen in xenotransplantierten medullären Mammakarzinomen unterschiedlichen Feuchtgewichtes (tww) bei Normothermie (T = 34°C). Die Pfeile kennzeichnen die mittleren pH-Werte (N = Anzahl der untersuchten Tumoren, n = Anzahl der Meßwerte)

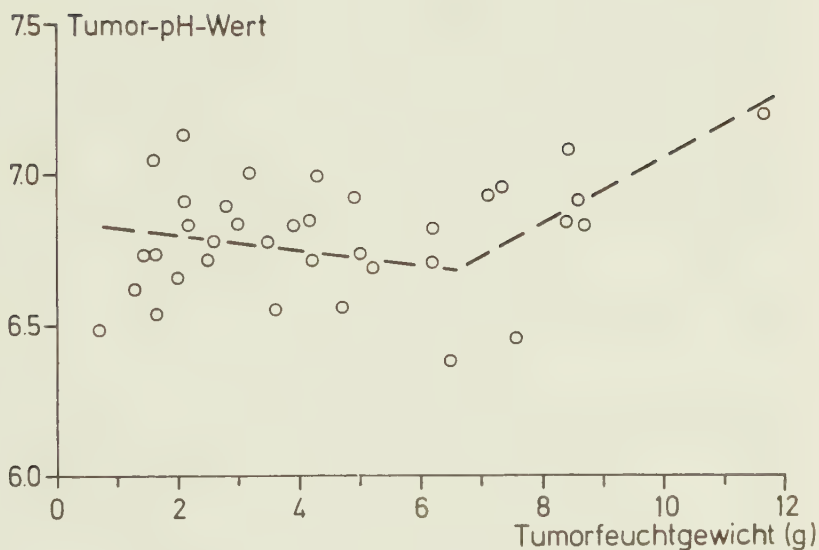


Abb.10: Mediane pH-Werte in 36 xenotransplantierten medullären Mammakarzinomen unterschiedlichen Feuchtgewichtes bei Normothermie ($T = 34^{\circ}\text{C}$). Die gestrichelte Kurve soll den Trend verdeutlichen.

Plattenepithelkarzinom der menschlichen Brustdrüse (xenotransplantiert in rnu/rnu-Ratten) deutlich nach rechts verschoben ($2 p < 0,002$; Abb. 6c). Die pH-Werte in den Plattenepithelkarzinomen sind um einen mittleren pH-Wert von $7,04 \pm 0,19$ normal verteilt; ca. 60% der in diesen Karzinomen gemessenen Werte liegen oberhalb $pH = 7,0$. Bei diesem Tumor ist darüber hinaus die Veränderung der gemessenen pH-Verteilung mit zunehmendem Tumorgewicht deutlicher ausgeprägt. Tumoren mit Feuchtgewichten um 1,6 g zeigen noch einen mittleren pH-Wert unter 7,0. Die pH-Verteilung von xenotransplantierten Plattenepithelkarzinomen mit Feuchtgewichten um 4,2 g ist zu höheren Werten verschoben und liegt um einen mittleren pH-Wert von $7,10 \pm 0,18$ (Abb.11). Bei diesen Karzinomen nehmen die medianen pH-Werte nur bei sehr kleinen Tumorgewichten ab. Dieser pH-Abfall bei kleinen Tumorgewichten ist (wie bei den medullären Karzinomen) von einem geringgradigen pH-Anstieg gefolgt (Abb.12).

Im Vergleich zu den Xenotransplantaten des untersuchten medullären Mammakarzinoms ist die pH-Verteilung in den Plattenepithelkarzinomen bereits bei mittleren Tumorgewichten unter 2 g zu deutlich höheren Werten verschoben (s. Abb.9, oben und Abb.11, oben). Mit zunehmender TumorgroÙe auf Feuchtgewichte um 4,2 g werden diese Unterschiede noch ausgeprägter (vgl. Abb.9, Mitte und Abb.11, unten).

Bei der histologischen Untersuchung der Plattenepithelkarzinomen ist auffällig, daß in diesen Tumoren regressive Veränderungen und Nekrosen bereits in frühen Wachstumsstadien auftreten und daß sich in schwereren Tumoren große konfluierende Nekrosenzonen bilden. In den untersuchten Yoshida-Sarkomen und in den xenotransplantierten medullären Mammakarzinomen hingegen treten erst in größeren Tumoren kleinleckige Nekrosen auf. Darüberhinaus erreichen in diesen Tumoren die Nekroseareale im Mittel nicht den Anteil am Tumorgesamtvolumen, der in den Xenotransplantaten des unter-

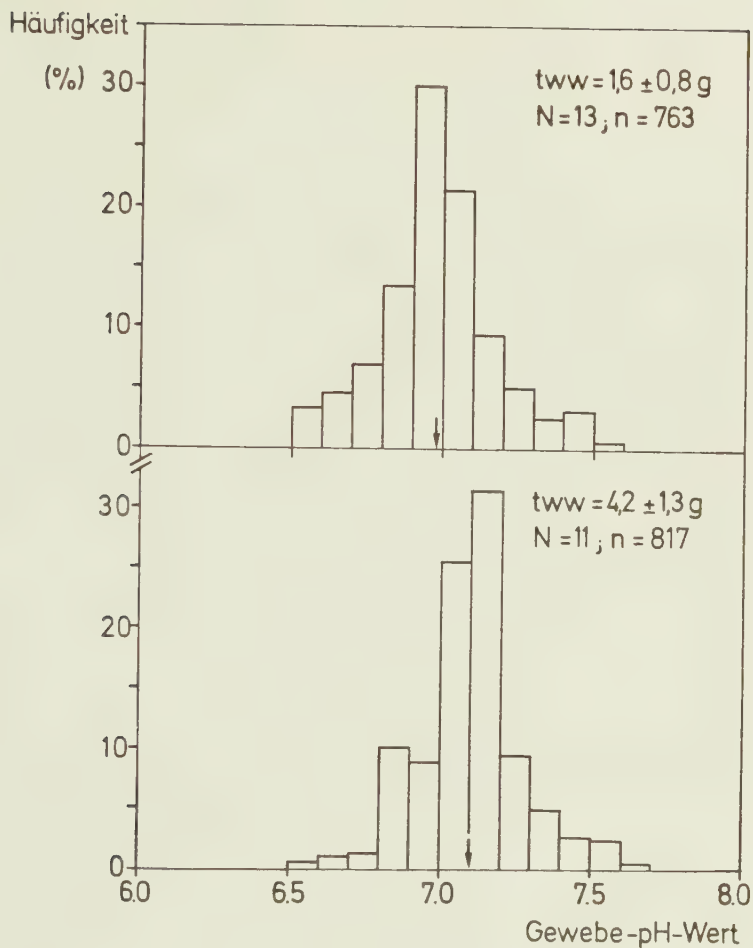


Abb.11: pH-Häufigkeitsverteilungen in xenotransplantierten Plattenepithelkarzinomen der menschlichen Brustdrüse unterschiedlichen Feuchtgewichtes (tww) bei Normo-thermie ($T = 34^{\circ}\text{C}$). Die Pfeile kennzeichnen die mittleren pH-Werte (N = Anzahl der untersuchten Tumoren, n = Anzahl der Meßwerte)

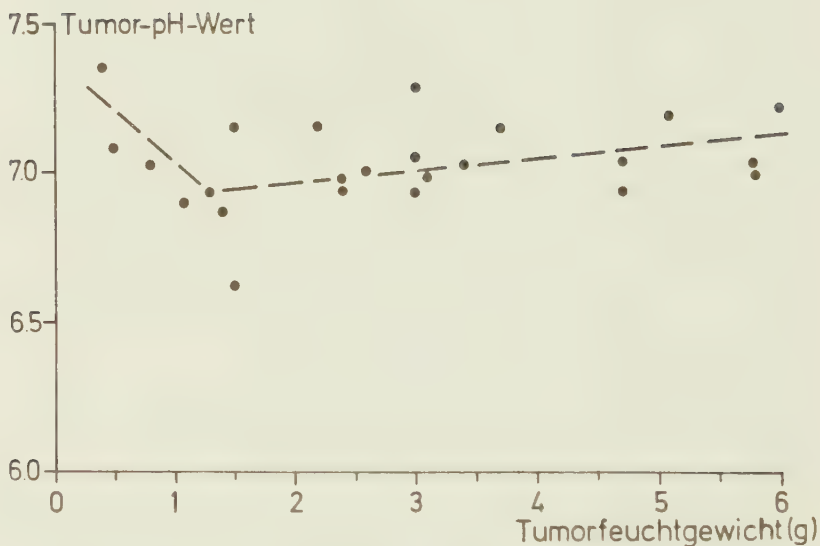


Abb.12: Mediane pH-Werte in 24 Xenotransplantaten eines Plattenepithelkarzinoms der menschlichen Brustdrüse unterschiedlichen Feuchtgewichtes bei Normothermie ($T = 34^{\circ}\text{C}$). Die gestrichelte Kurve soll den Trend verdeutlichen.

suchten Plattenepithelkarzinoms durchschnittlich vorhanden ist.

Wegen der relativ geringen Zahl und der hohen biologischen Variabilität der untersuchten Spontantumoren ist eine eingehende Analyse der gefundenen pH-Verteilung schwierig. Als Ergebnis läßt sich festhalten, daß auch spontane Brusttumoren der Sprague-Dawley-Ratte eine Tumorzidose aufweisen. Dies trifft für maligne Tumoren (s.Abb.6d) ebenso zu wie für benigne Veränderungen (vgl. Tab.4). Dysplasien zeigen einen Trend zu pH-Werten, die etwas unter denen des Normalgewebes, aber über denen maligner Tumoren liegen.

Zusammenfassend läßt sich somit festhalten, daß 70% der in isotransplantierten Yoshida-Sarkomen, in xenotransplantierten medullären Mammakarzinomen und in spontanen malignen Brusttumoren der Sprague-Dawley-Ratte gemessenen pH-Werte unterhalb pH 7,0 liegen. Im Gegensatz dazu liegen 60% der in den Xenotransplantaten des untersuchten Plattenepithelkarzinoms der menschlichen Brustdrüse gemessenen pH-Werte oberhalb 7,0. In letztgenannten Tumoren geht dies einher mit dem Auftreten von regressiven Veränderungen und von Nekrosen bereits in frühen Wachstumsstadien.

Bei den Yoshida-Sarkomen war es möglich, die pH-Meßelektroden systematisch konzentrisch in den Tumor einzustechen. Es zeigt sich bei allen Gewichtsklassen, daß das Tumorzentrum im Mittel saurer ist als die Tumorpheripherie, d.h. die Tumor-Gewebe-pH-Verteilung verschiebt sich von der Tumorschale zum Tumorzentrum deutlich zu niedrigeren Werten ($2p < 0,002$; s.Abb.13). Der mittlere pH-Wert in einer äußeren Schicht von 0,5 - 3,5 mm aller bei Normothermie untersuchten Yoshida-Sarkome beträgt $6,95 \pm 0,18$ (Median: 6,96; Modalklasse: 6,90 - 6,99; pH-Bereich: 6,52 - 7,70) und in einer mittleren Schicht von 4 - 7 mm $6,84 \pm 0,16$ (Median: 6,87; Modalklasse: 6,90 - 6,99; pH-Bereich: 6,48 - 7,29). In

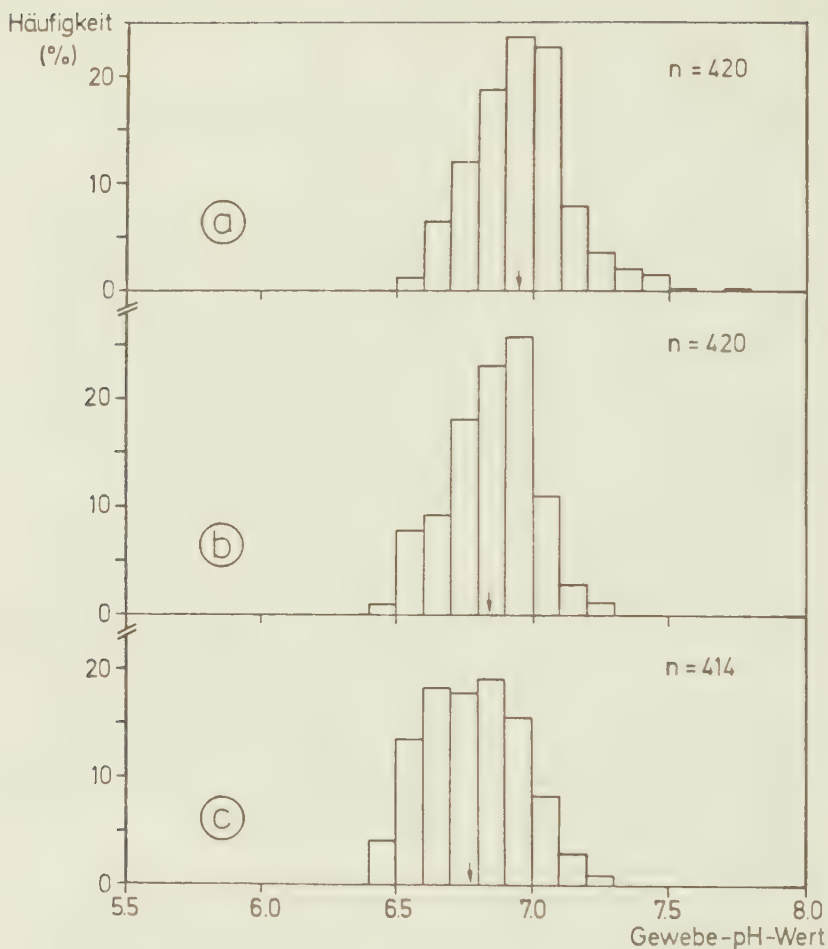


Abb.13: Häufigkeitsverteilungen der in den Bereichen 0,5 - 3,5 mm (a), 4,0 - 7,0 mm (b) und 7,5 - 10,5 mm (c) der Stichkanäle in 30 Yoshida-Sarkomen bei Normo-thermie ($T = 34^{\circ}\text{C}$) gemessenen pH-Werte. Die Pfeile kennzeichnen die mittleren pH-Werte (n = Anzahl der Meßwerte)

zentralen Arealen (7,5 - 10,5 mm) liegt die pH-Verteilung um einen mittleren pH-Wert von $6,78 \pm 0,18$ mit einem medianen Wert von 6,78. Der pH-Bereich reicht von 6,42 bis 7,27 mit einer Modalklasse von 6,80 - 6,89.

Abweichend von diesem im vorausgehenden Abschnitt beschriebenen Verhalten können in individuellen Tumoren jedoch große pH-Gradienten, eine Abnahme des pH-Wertes, die von einem Wiederanstieg gefolgt ist und ein pH-Anstieg mit einem nachfolgenden pH-Abfall gefunden werden (Abb.14).

3.2. Veränderungen der pH-Verteilungen während und nach einer lokalisierten Ultraschallüberwärmung von 44°C für 60 Minuten

Die relevanten statistischen Parameter der pH-Verteilungen in Subkutis, Yoshida-Sarkomen, xenotransplantierten medullären menschlichen Mammakarzinomen und in Xenotransplantaten eines Plattenepithelkarzinoms der menschlichen Brustdrüse direkt und 24 - 28 Stunden nach einer lokalisierten Ultraschallüberwärmung (44°C, 60 min) sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

3.2.1. Subkutis

Der mittlere pH-Wert in der Subkutis des Fußrückens der Sprague-Dawley-Ratte beträgt direkt nach der lokalen Ultraschallüberwärmung (44°C, 60 min) $7,35 \pm 0,09$, am Tag nach der Hyperthermieranwendung $7,32 \pm 0,07$. Diese Werte weisen darauf hin, daß sich der pH-Wert der Subkutis durch die lokalisierte Ultraschallüberwärmung nicht ändert.

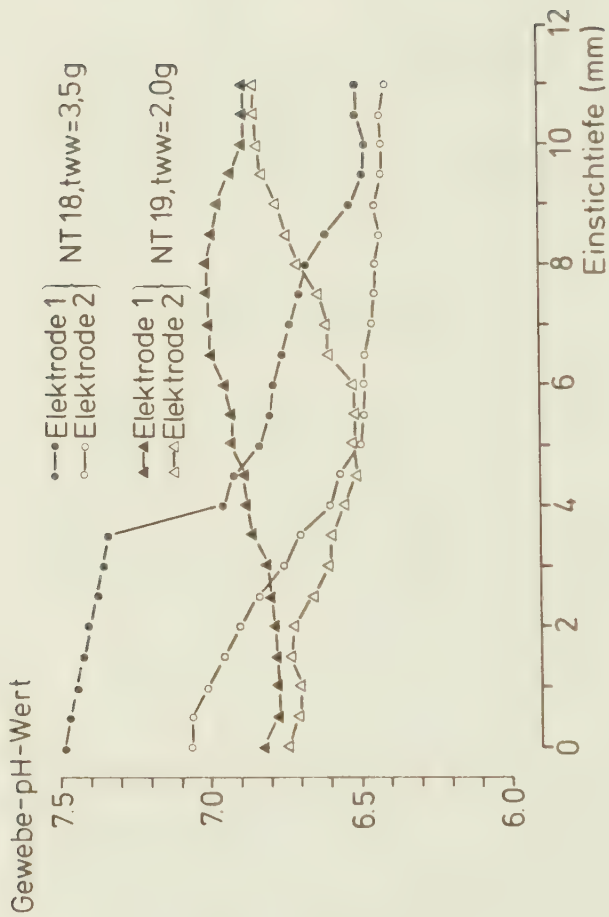


Abb.14: pH-Profile in zwei isotransplantierten Yoshida-Sarkomen unterschiedlichen Feuchtgewichtes (tww) bei Normothermie ($T = 34^{\circ}\text{C}$).

Tabelle 5: Statistische Parameter der pH-Verteilungen in der Subkutis des Fußrückens der Sprague-Dawley-Ratte (SD SC), in isotransplantierten Yoshida-Sarkomen (SD Yosh), in xenotransplantierten medullären menschlichen Mammarkarzinomen (NR MED) und in Xenotransplantaten eines Plattenepithelkarzinoms der menschlichen Brustdrüse (NR ANA) direkt (HT) und 24 - 28 Stunden (HNT) nach einer lokalisierten Ultraschall-hyperthermie (44°C, 60 min) bei unterschiedlichen Aufheizraten (a: $\Delta T/\Delta t > 1,5^\circ\text{C}/\text{min}$, b: $\Delta T/\Delta t < 0,7^\circ\text{C}/\text{min}$; tww = mittleres Tumorflechtgewicht, N = Anzahl der untersuchten Tiere bzw. Tumoren, n = Anzahl der Meßwerte, pH = mittlerer pH-Wert, s_x = Standardabweichung).

	N	n	pH	s_x	Median	Modalklasse	pH-Bereich
SD SC HT ^a	10	20	7,35	0,09	7,36	7,30 - 7,39	7,12 - 7,51
SD SC HNT ^a	10	20	7,32	0,07	7,32	7,20 - 7,29	7,21 - 7,48
SD Yosh HT gesamt ^a	36	1784	6,71	0,20	6,71	6,70 - 6,79	5,57 - 7,42
tww = 1,5 g ^a	10	448	6,84	0,17	6,84	6,70 - 6,79	6,23 - 7,42
tww = 2,4 g ^a	16	904	6,63	0,15	6,63	6,60 - 6,69	6,33 - 7,19
tww = 2,2 g ^b	10	695	6,49	0,16	6,50	6,50 - 6,59	6,03 - 7,03
tww = 3,9 g ^b	10	432	6,75	0,23	6,80	6,80 - 6,89	5,57 - 7,38
SD Yosh HNT gesamt ^a	30	1467	6,88	0,21	6,88	6,80 - 6,89	6,39 - 7,62
tww = 1,5 g ^a	10	518	6,88	0,21	6,89	6,90 - 6,99	6,40 - 7,62
tww = 2,4 g ^a	10	490	6,92	0,22	6,88	6,70 - 6,79	6,41 - 7,58
tww = 3,9 g ^b	10	459	6,85	0,21	6,86	6,80 - 6,89	6,39 - 7,43
NR MED HT gesamt ^b	32	2291	6,75	0,18	6,76	6,70 - 6,79	6,00 - 7,74
tww = 2,9 g ^b	17	1180	6,74	0,19	6,76	6,80 - 6,89	6,12 - 7,08
tww = 6,8 g ^b	15	1111	6,77	0,17	6,76	6,70 - 6,79	6,00 - 7,74
NR ANA HT ^b	13	972	6,89	0,18	6,87	6,80 - 6,89	6,36 - 7,64

3.2.2. Tumoren

Die Ergebnisse der an subkutanen Yoshida-Sarkomen durchgeführten Untersuchungen belegen, daß die in den Yoshida-Sarkomen herrschende Tumorazidose durch eine lokalisierte Ultraschallhyperthermie (HT) von 44°C für 60 Minuten weiter verstärkt wird. Das Ausmaß der pH-Absenkung unter der Hyperthermie ist abhängig von der Tumorgröße und der Geschwindigkeit der Temperatursteigerung während der Aufheizphase ($\Delta T/\Delta t$). Einen Tag nach der Hyperthermie ist die Überwärmungsbedingte pH-Absenkung nicht mehr nachzuweisen.

Betrachtet man die mit einer Aufheizrate größer als 1,5°C/min überwärmten Yoshida-Sarkome, so ist der mittlere Tumor-Gewebe-pH-Wert direkt nach der Überwärmung um 0,16 pH-Einheiten deutlich von $6,87 \pm 0,21$ auf $6,71 \pm 0,20$ abgefallen ($2p < 0,002$). Die Veränderungen der Häufigkeitsverteilung 24 - 28 Stunden nach der Hyperthermie sind gegenüber der Ausgangsverteilung nur diskret (mittlerer pH-Wert: 6,88 $\pm 0,21$; s.Abb.15).

Am deutlichsten ist dieses Verhalten bei Tumoren mit Feuchtgewichten um 2,4 g ausgeprägt (s.Abb.16). In dieser Gewichtsklasse liegen die Meßwerte bei Normothermie zwischen pH 6,46 und 7,77 um einen mittleren pH-Wert von $6,89 \pm 0,24$. Nach der lokalen Ultraschallüberwärmung ($\Delta T/\Delta t > 1,5^\circ\text{C}/\text{min}$) ist die pH-Verteilung deutlich nach links zu niedrigeren Werten verschoben (mittlerer pH-Wert: $6,63 \pm 0,15$; $2p < 0,002$). 24 - 28 Stunden nach der Überwärmung ist der mittlere Gewebe-pH-Wert in den untersuchten Tumoren mit $6,92 \pm 0,22$ praktisch wieder zum Ausgangswert zurückgekehrt. Die Form der Verteilung hat sich allerdings geändert; die Verteilungskurve ist nun linksschief mit einer Modalklasse von 6,70 - 6,79. Weiterhin hat sich der Anteil der pH-Werte oberhalb 7,1 von 11 auf 22% erhöht.

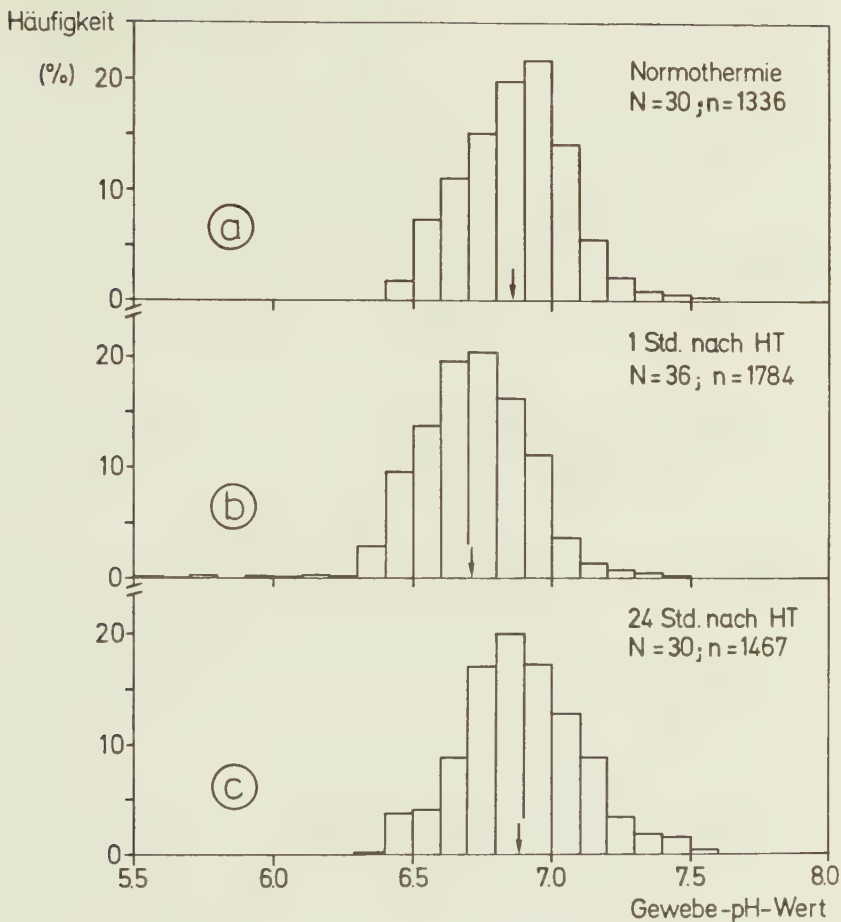


Abb.15: Häufigkeitsverteilungen der in isotransplantierten Yoshida-Sarkomen vor (a), 1 Stunde (b) und 1 Tag (c) nach einer lokalisierten Ultraschallhyperthermie (44°C , 60 min; $\Delta T/\Delta t > 1,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) gemessenen pH-Werte. Die Pfeile kennzeichnen den jeweiligen mittleren pH-Wert (N = Anzahl der untersuchten Tumoren, n = Anzahl der Meßwerte, HT = Hyperthermie).

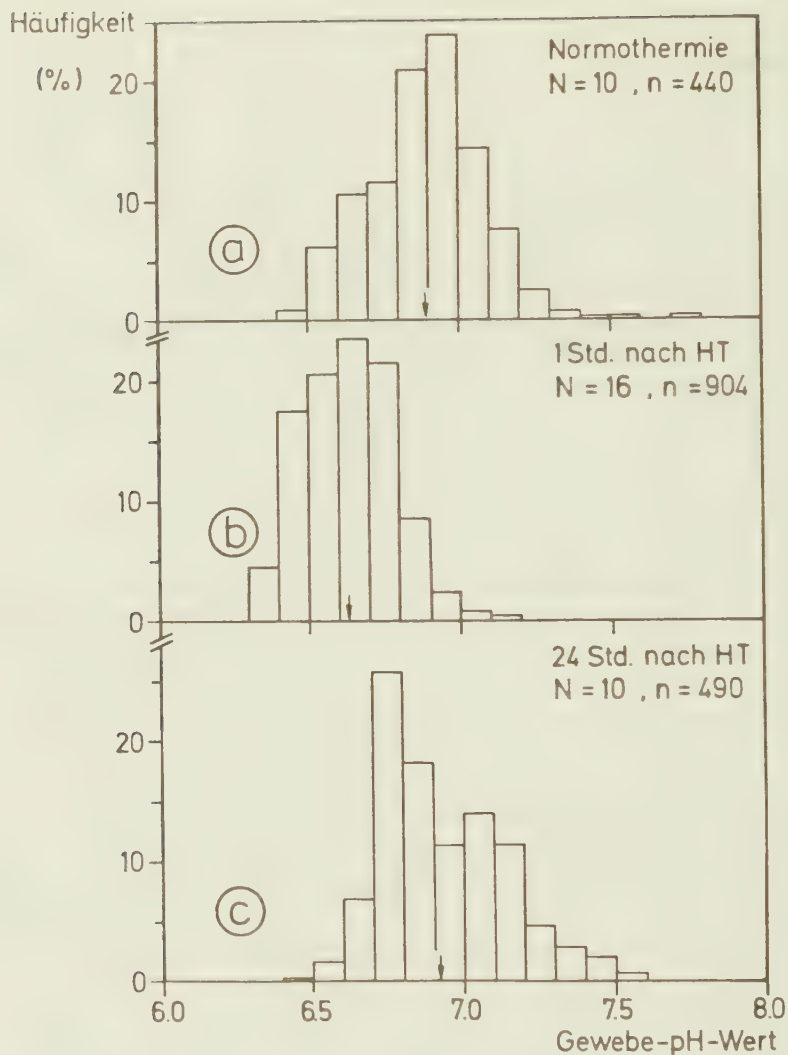


Abb.16: Häufigkeitsverteilungen der in etwa 2,4 g schweren isotransplantierten Yoshida-Sarkomen vor (a), 1 Stunde (b) und 1 Tag (c) nach einer lokalisierten Ultraschallhyperthermie (44°C, 60 min; $\Delta T/\Delta t > 1,5^\circ\text{C}/\text{min}$) gemessenen pH-Werte. Die Pfeile kennzeichnen den jeweiligen mittleren pH-Wert (N = Anzahl der untersuchten Tumoren, n = Anzahl der Meßwerte)

In Tumoren mit gleicher Aufheizrate, aber Feuchtgewichten um 4 g ist die Wirkung der Hyperthermie auf den gemessenen Gewebe-pH-Wert ähnlich, aber weniger ausgeprägt (s. Abb.17). Die pH-Verschiebung zu niedrigeren Werten beträgt nur 0,11 pH-Einheiten ($2p < 0,002$). In kleineren Tumoren (mittleres Feuchtgewicht um 1,5 g) sind nur geringfügige Änderungen der Tumorgewebe-pH-Verteilung durch die lokale Ultraschallhyperthermie erkennbar (s.Abb.18).

Der Einfluß der Temperaturänderung pro Zeiteinheit während der Aufwärmphase der Tumoren wird beim Vergleich der pH-Verteilungen in ca. 2,4 g schweren Tumoren 1 Stunde nach der Überwärmung mit identischem Hyperthermieniveau und gleicher Hyperthermiedauer (44°C , 60 min), aber unterschiedlicher Aufheizrate deutlich (s.Abb.19). Wie oben angegeben, zeigen Tumoren dieser Feuchtgewichte, die mit einer Aufheizrate $\Delta T/\Delta t > 1,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erwärmt wurden, eine Absenkung des mittleren pH-Wertes um 0,26 pH-Einheiten gegenüber dem Ausgangswert. Eine langsamere Erwärmung mit einer Aufheizrate $\Delta T/\Delta t < 0,7^{\circ}\text{C}/\text{min}$, d.h. eine Verfünfachung der Dauer der Aufheizphase, führt zu einer weiteren deutlichen Linksverschiebung der gefundenen pH-Verteilung um im Mittel 0,14 pH-Einheiten ($2p < 0,002$). Das bedeutet, daß eine langsamere Erwärmung den pH-Wert in ca. 2,4 g schweren subkutanen Yoshida-Sarkomen im Mittel um insgesamt 0,4 pH-Einheiten und somit deutlich stärker als eine rasche Aufheizung senkt.

Der unter Normothermiebedingungen von der Tumorperipherie zum Tumorzentrum bestehende Gradient der Wasserstoffionenkonzentration wird unter lokalisierter Ultraschallhyperthermie (44°C , 60 min) etwas geringer. Dies wird verursacht durch eine etwas stärkere Absenkung des pH-Wertes in der Tumorperipherie verglichen mit dem Tumorzentrum unter der Überwärmung. Unter der Wärmebehandlung sinkt der mittlere pH-Wert der Randschale (0,5 - 3,5 mm) um 0,13 pH-Einheiten von $6,95 \pm 0,18$ auf $6,82 \pm 0,23$ ab (s.Abb.20; $2p <$

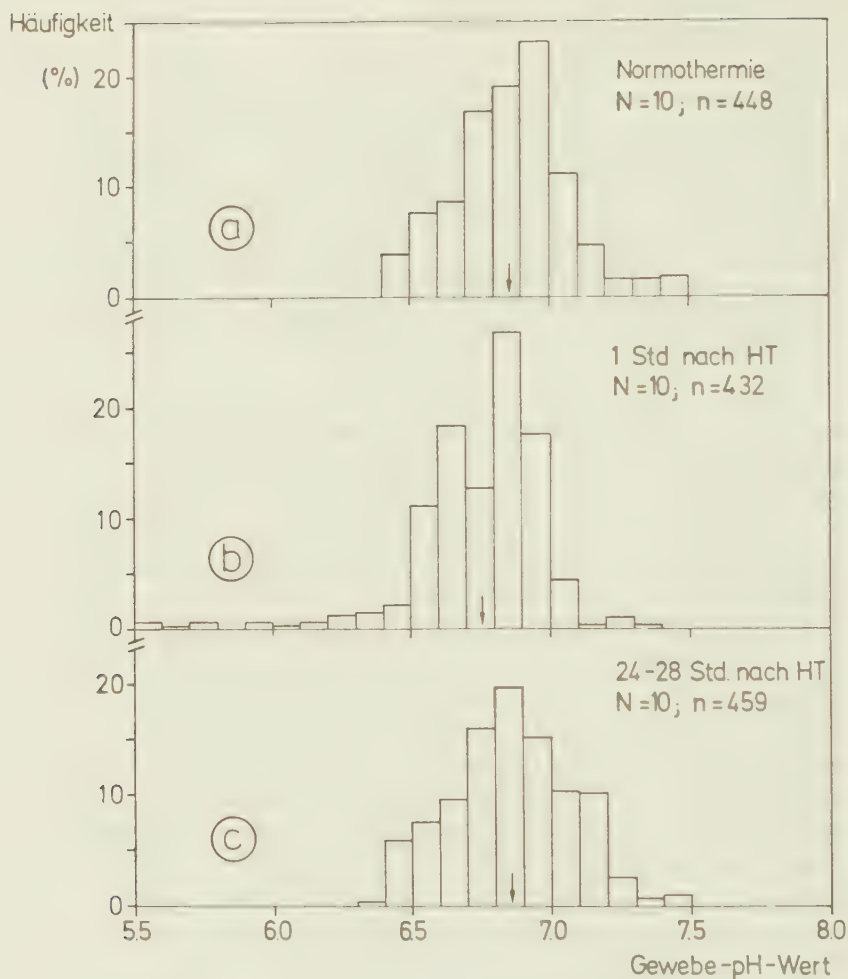


Abb.17: Häufigkeitsverteilungen der in ca. 4 g schweren isotransplantierten Yoshida-Sarkomen vor (a), 1 Stunde (b) und 1 Tag (c) nach einer lokalisierten Ultraschallhyperthermie (44°C , 60 min; $\Delta T/\Delta t > 1,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) gemessenen pH-Werte. Die Pfeile kennzeichnen den jeweiligen mittleren pH-Wert (N = Anzahl der untersuchten Tumoren, n = Anzahl der Meßwerte)

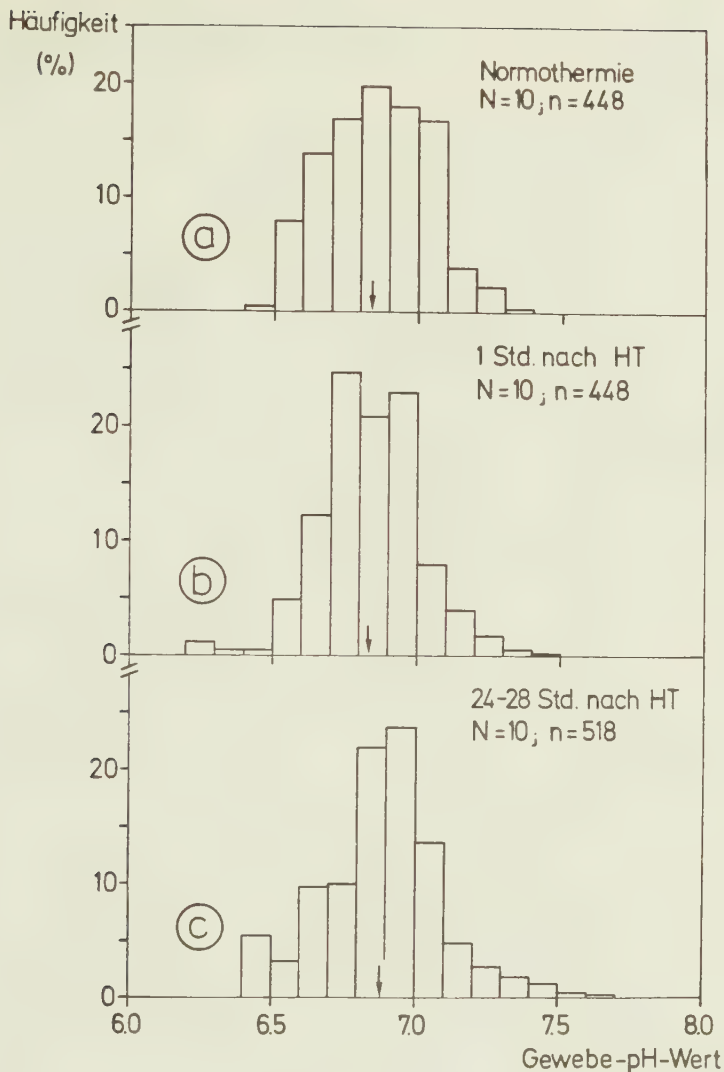


Abb.18: Häufigkeitsverteilungen der in ca. 1,4 g schweren iostransplantierten Yoshida-Sarkomen vor (a), 1 Stunde (b) und 1 Tag (c) nach einer lokalisierten Ultraschallhyperthermie (44°C, 60 min; $\Delta T/\Delta t > 1,5^\circ\text{C}/\text{min}$) gemessenen pH-Werte. Die Pfeile kennzeichnen die jeweiligen mittleren pH-Werte (N = Anzahl der untersuchten Tumoren, n = Anzahl der Meßwerte)

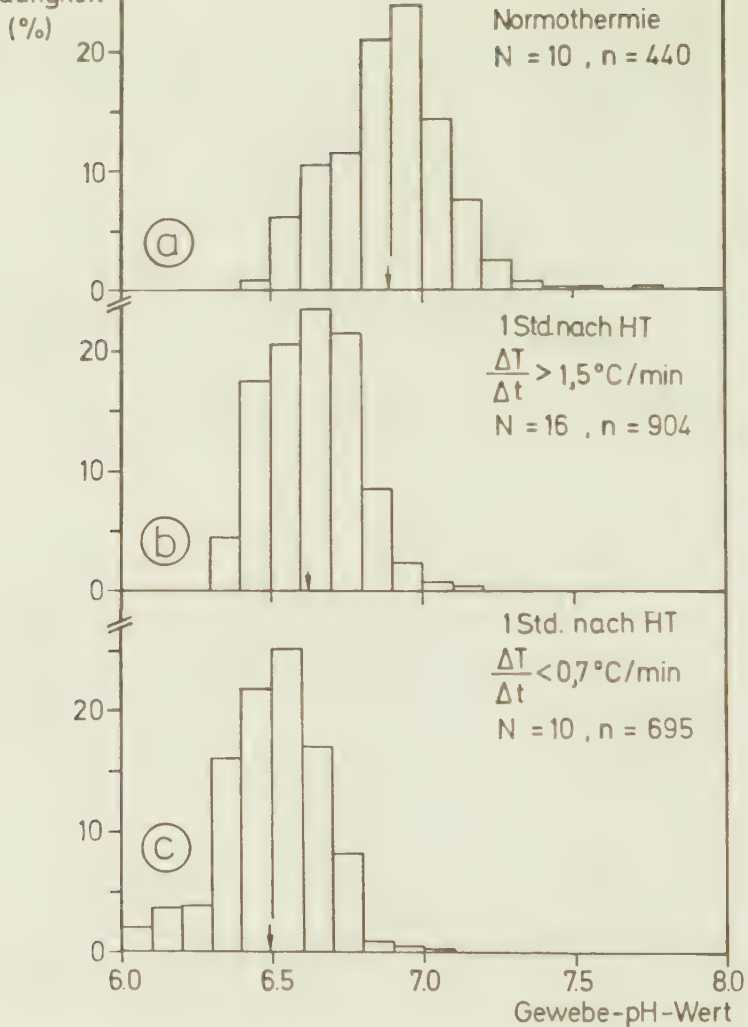


Abb.19: Häufigkeitsverteilungen der in ca. 2,4 g schweren Yoshida-Sarkomen vor (a) und 1 Stunde nach einer lokalisierten Ultraschallhyperthermie (44°C, 60 min) (b und c) gemessenen pH-Werte. $\Delta T/\Delta t$ gibt die Temperatursteigerung pro Zeiteinheit im Tumorgewebe während der Aufwärmphase vor Erreichen des Hyperthermieniveaus an. Die Pfeile kennzeichnen den jeweiligen mittleren pH-Wert (N = Anzahl der untersuchten Tumoren, n = Anzahl der Meßwerte)

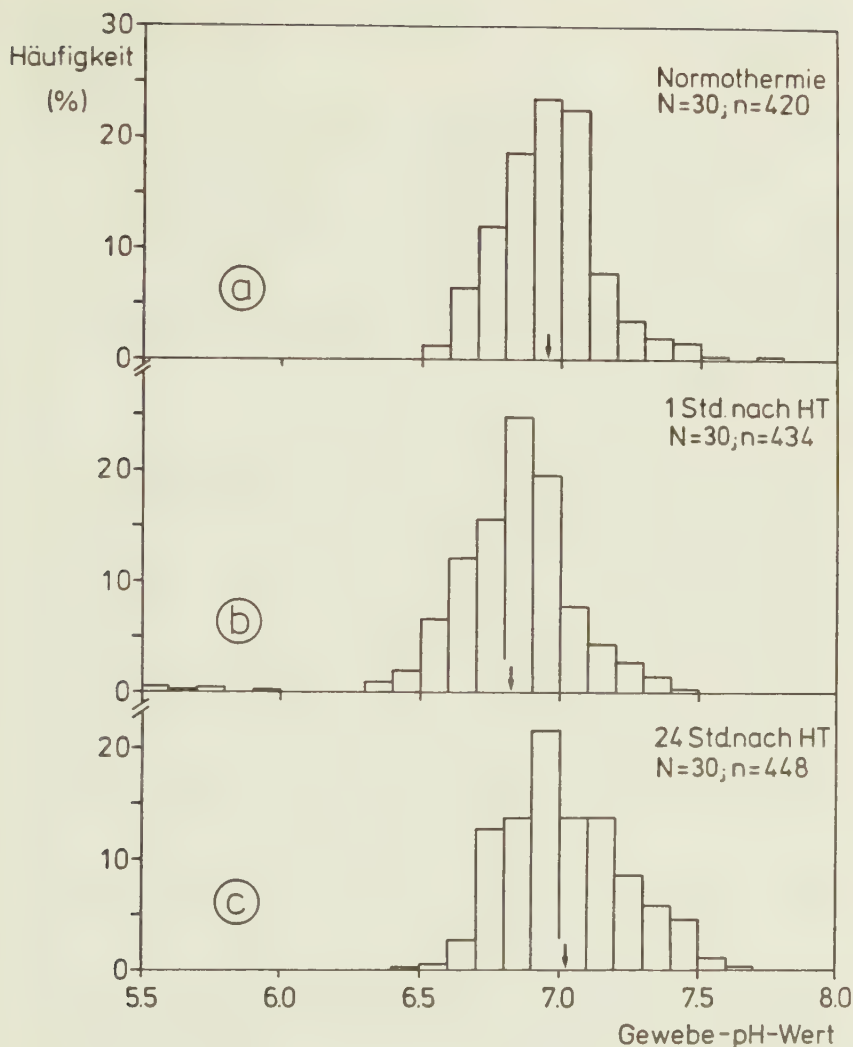


Abb.20: Histogramme der in der Peripherie (0,5 - 3,5 mm) von Yoshida-Sarkomen vor (a), 1 Stunde (b) und 1 Tag (c) nach einer lokalisierten Ultraschallhyperthermie (44°C, 60 min; $\Delta T/\Delta t > 1,5^\circ\text{C}/\text{min}$) gemessenen pH-Werte. Die Pfeile kennzeichnen die mittleren pH-Werte (N = Anzahl der untersuchten Tumoren, n = Anzahl der Meßwerte)

0,01). Die pH-Verteilung der mittleren Abschnitte (4,0 - 7,0 mm) der einzelnen Stichkanäle verschiebt sich ebenfalls um 0,13 pH-Einheiten zu niedrigeren Werten (s. Abb. 21; $2p < 0,002$), wohingegen das Zentrum (7,5 - 10,5 mm) nur um 0,08 pH-Einheit saurer wird (s. Abb. 22; $2p < 0,02$). 24 - 28 Stunden nach der Überwärmung sind die Verteilungen praktisch wieder zu den Verhältnissen vor der Hyperthermie zurückgekehrt. Diese Daten sind in Form von kumulativen Häufigkeitsverteilungen in Abb. 23 zusammengefaßt.

Auch in den untersuchten Plattenepithelkarzinomen (mittleres Tumorgefeuchtgewicht: $3,6 \pm 2,2$ g) verschiebt sich die Verteilung unter lokaler Ultraschallüberwärmung (44°C , 60 min) deutlich zu niedrigeren Werten ($2p < 0,002$; s. Abb. 24). Der mittlere pH-Wert von 13 Tumoren aus der Normothermiegruppe, deren Gewicht möglichst wenig von dem mittleren Feuchtgewicht der Tumoren der Hyperthermiegruppe abwich, (mittleres Tumorgefeuchtgewicht: $3,6 \pm 1,3$ g) beträgt $7,09 \pm 0,18$ (Median: 7,09; Modalklasse: 7,10 - 7,19; pH-Bereich: 6,58 - 7,62). Direkt nach der Überwärmung ist der mittlere pH-Wert um 0,2 pH-Einheiten auf $6,89 \pm 0,18$ abgefallen (Median: 6,87; Modalklasse: 6,80 - 6,89; pH-Bereich: 6,36 - 7,64). Dabei tritt zwischen pH 7,2 und 7,4 eine Lücke in der Verteilung auf. Werte oberhalb 7,4 sind einem Stichkanal in einem 4,2 g schweren Tumor zuzuschreiben.

In den Xenotransplantaten des untersuchten medullären Karzinoms ist die pH-Absenkung während einer lokalisierten Ultraschallhyperthermie (44°C , 60 min) geringer ausgeprägt als in den Xenotransplantaten des Plattenepithelkarzinoms und in den Yoshida-Sarkomen (s. Abb. 25). Der mittlere pH-Wert der untersuchten medullären Mammakarzinomen (Feuchtgewichte um 4,5 g) liegt unter Normothermie bei $6,82 \pm 0,24$ (Median: 6,83; Modalklasse: 6,80 - 6,89; pH-Bereich: 5,78 - 7,57). Direkt nach der Überwärmungsbehandlung ist die Verteilung um 0,07 pH-Einheiten zu tieferen pH-Werten verschoben (mittlere

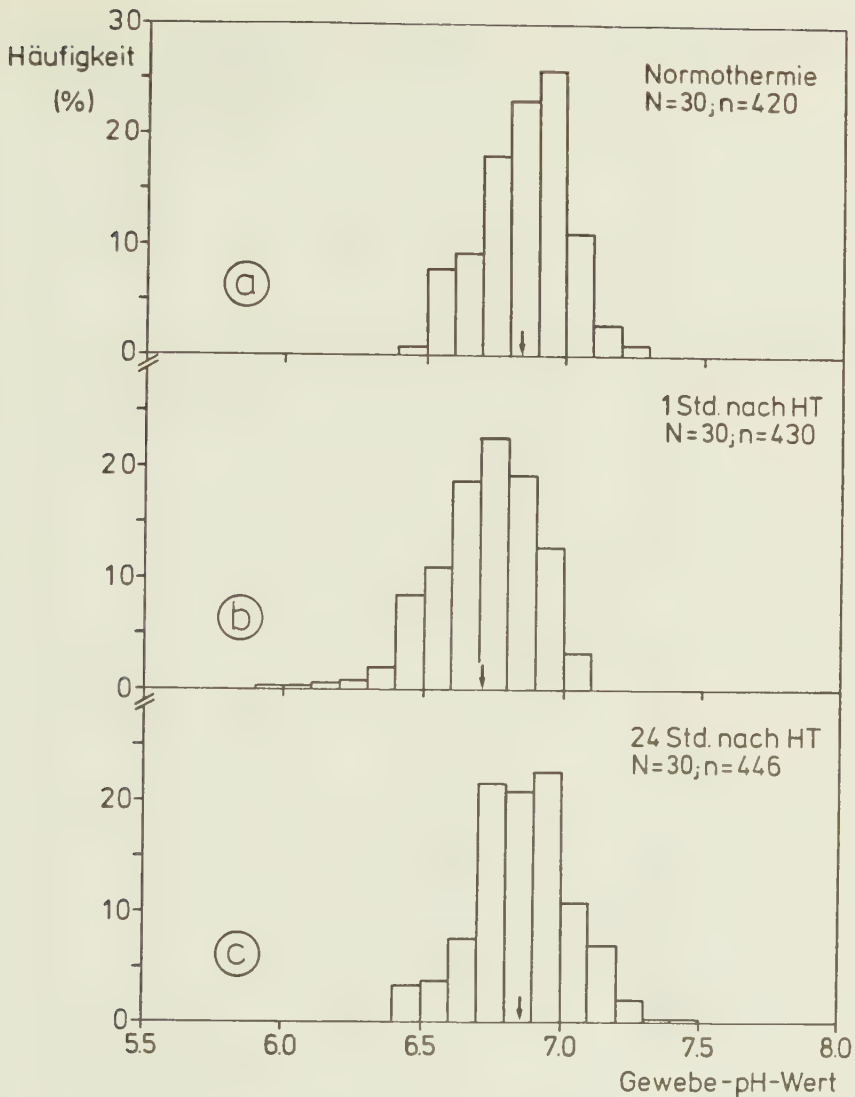


Abb.21: Histogramme der in intermediären Bereichen (4 - 7 mm) von Yoshida-Sarkomen vor (a), 1 Stunde (b) und 1 Tag (c) nach einer lokalisierten Ultraschallhyperthermie (44°C, 60 min; $\Delta T/\Delta t > 1,5^\circ\text{C}/\text{min}$) gemessenen pH-Werte. Die Pfeile kennzeichnen den jeweiligen mittleren pH-Wert (N = Anzahl der untersuchten Tumoren, n = Anzahl der Meßwerte)

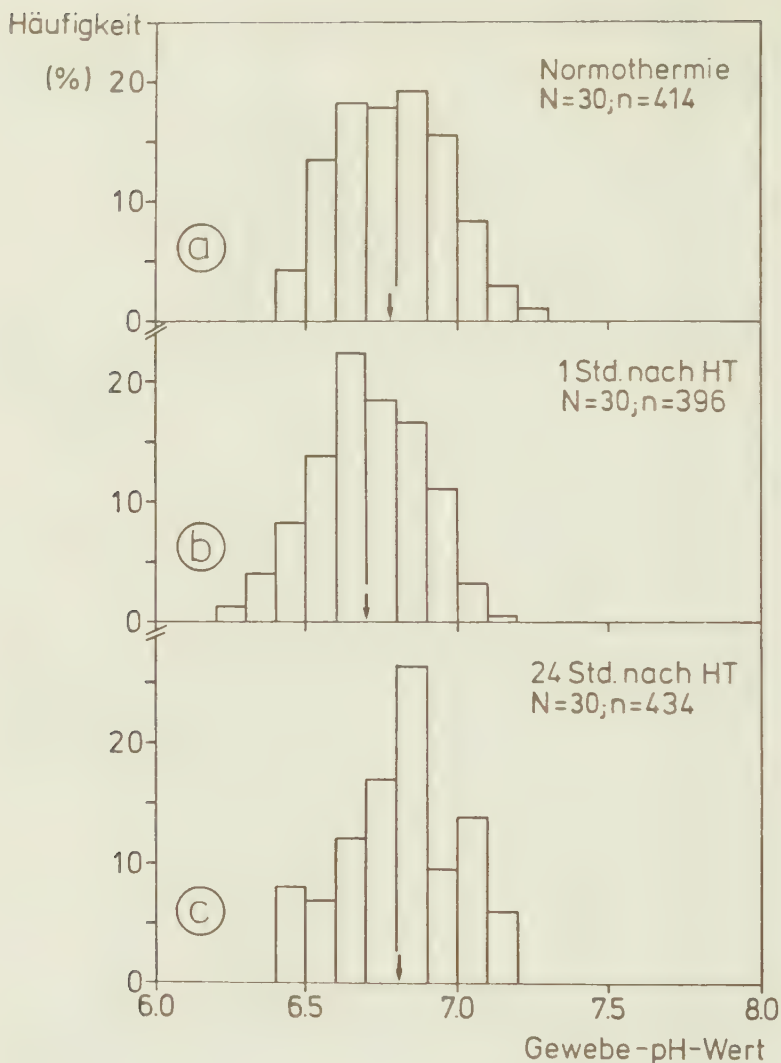


Abb.22: Histogramme der in den zentralen Bereichen (7,5 - 10,5 mm) von Yoshida-Sarkomen vor (a), 1 Stunde (b) und 1 Tag (c) nach einer lokalisierten Ultraschallhyperthermie (44°C, 60 min; $\Delta T/\Delta t > 1,5^\circ\text{C}/\text{min}$) gemessenen pH-Werte. Die Pfeile kennzeichnen die mittleren pH-Werte (N = Anzahl der untersuchten Tumoren, n = Anzahl der Meßwerte)

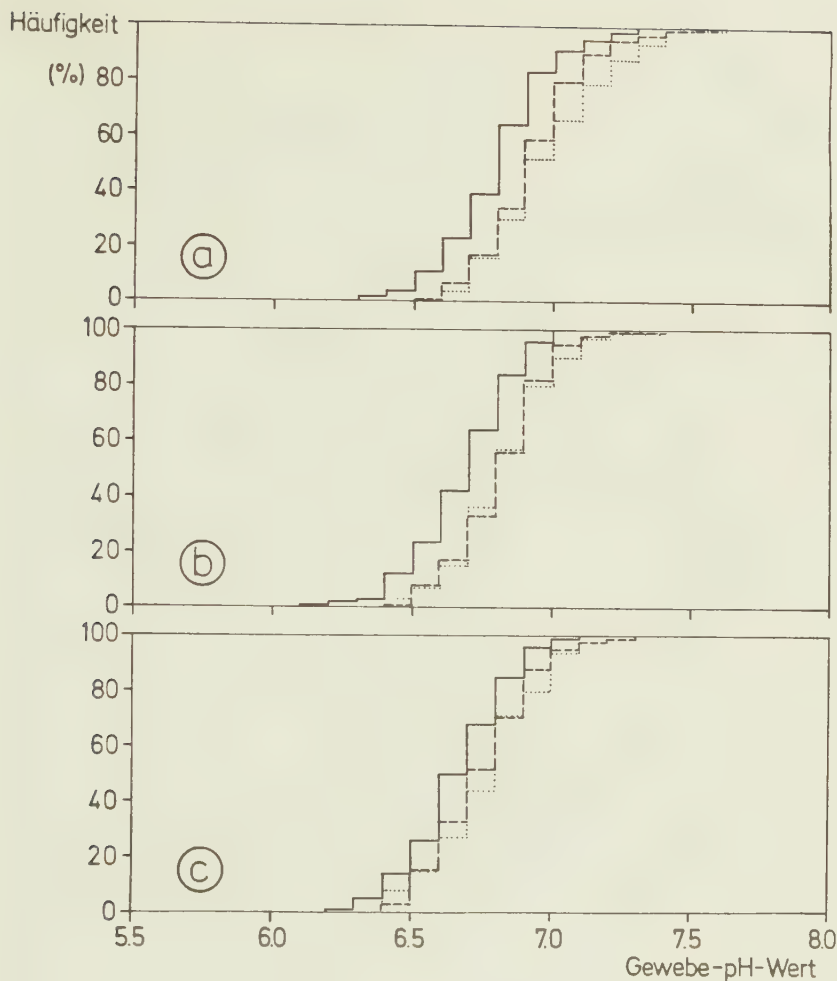


Abb.23: Kumulative Häufigkeitsverteilungen der in der Peripherie (0,5 - 3,5 mm; a), in intermediären (4,0 - 7,0 mm; b) und im Zentrum (7,5 - 10,5 mm; c) von Yoshida-Sarkomen vor (gestrichelte Kurve), direkt nach (durchgezogene Kurve) und einen Tag nach (gepunktete Kurve) einer lokalisierten Ultraschallhyperthermie (44°C, 60 min; $\Delta T/\Delta t > 1,5^\circ\text{C}/\text{min}$) gemessenen pH-Werte

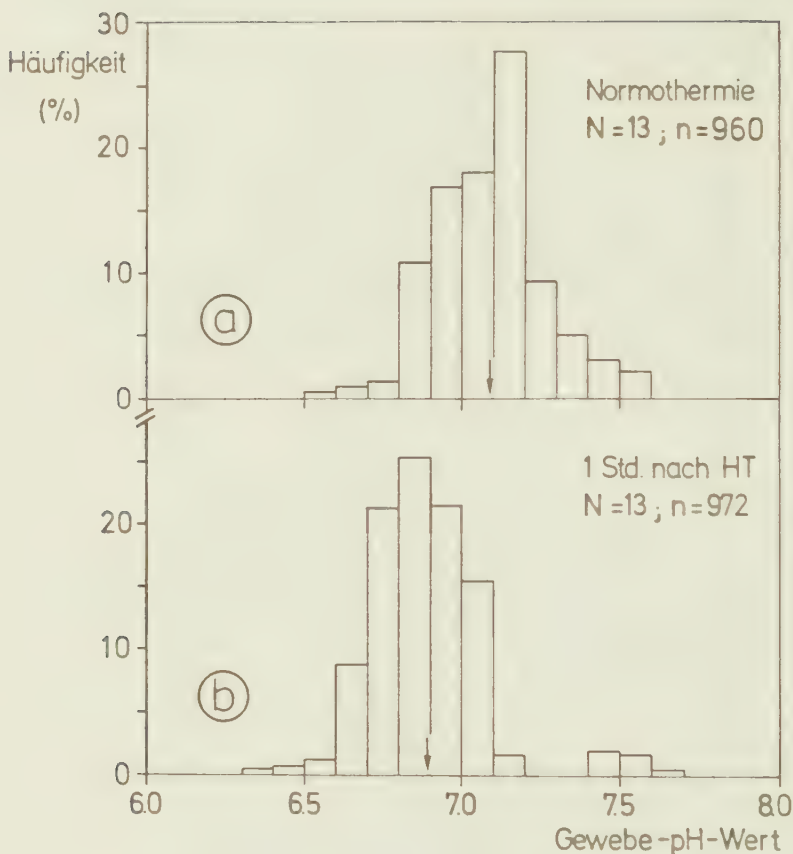


Abb.24: Häufigkeitsverteilungen der in ca. 3,6 g schweren Xenotransplantaten eines Plattenepithelkarzinoms der menschlichen Mamma vor (a) und 1 Stunde nach (b) einer lokalisierten Ultraschallhyperthermie (44°C, 60 min; $\Delta T/\Delta t < 0,7^\circ\text{C}/\text{min}$) gemessenen pH-Werte. Die Pfeile kennzeichnen den jeweiligen mittleren pH-Wert (N = Anzahl der untersuchten Tumoren, n = Anzahl der Meßwerte)

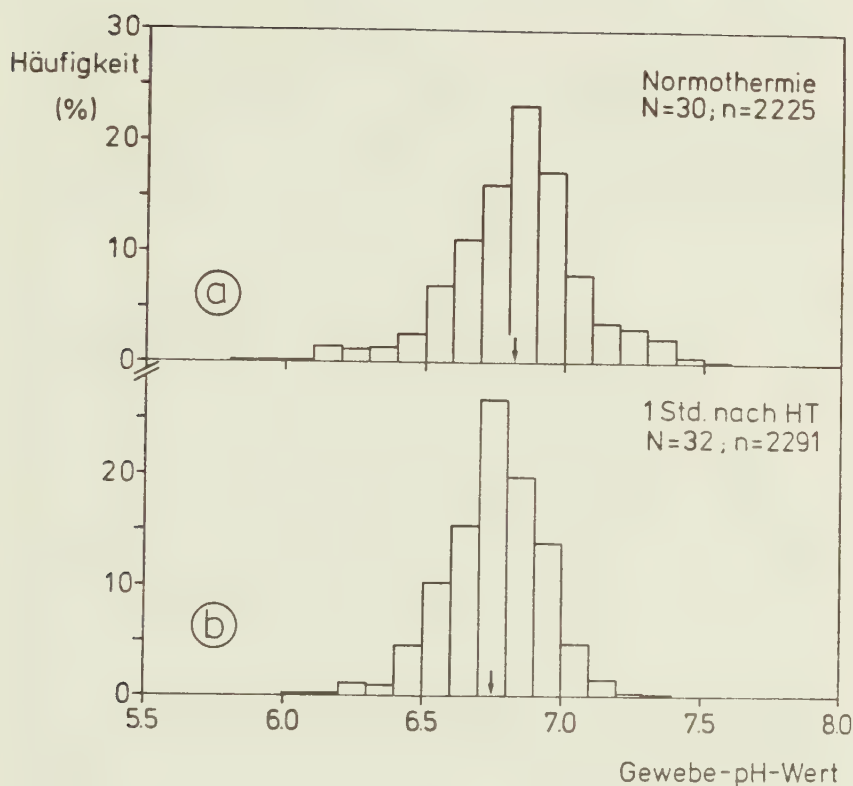


Abb.25: Häufigkeitsverteilungen der in ca. 4,5 g schweren Xenotransplantaten eines medullären menschlichen Mammakarzinoms vor (a) und 1 Stunde nach (b) einer lokalisierten Ultraschallhyperthermie (44°C, 60 min; $\Delta T/\Delta t < 0,7^\circ\text{C}/\text{min}$) gemessenen pH-Werte. Die Pfeile kennzeichnen die mittleren pH-Werte (N = Anzahl der untersuchten Tumoren, n = Anzahl der Meßwerte)

rer pH-Wert: $6,75 \pm 0,18$; Median: 6,76; Modalklasse: 6,70 - 6,79; pH-Bereich: 6,00 - 7,74). Die pH-Absenkung unter Hyperthermie tritt vor allem in kleineren medullären Mammakarzinomen auf (Tumorgewichte um 2,9 g), wobei die pH-Erniedrigung im Mittel 0,1 pH-Einheit beträgt (vgl. Abb.26). Größere medulläre Tumoren hingegen (Tumorgewicht um 6,8 g) verändern ihren mittleren pH-Wert während einer lokalen Überwärmung nur unwesentlich (s.Abb.27).

3.3. Änderungen des Gewichtes der tumorfreen und der tumortragenden Pfote unter lokaler Ultraschallüberwärmung (44°C, 60 min)

Unter der lokalen Wärmebehandlung bei 44°C für 60 Minuten nimmt das mittlere Gewicht der tumorfreen Rattenpfote von $2,1 \pm 0,1$ g auf $3,4 \pm 0,8$ g zu, was einer 50%igen Volumenzunahme entspricht. 24 - 28 Stunden nach der Überwärmung ist die mittlere Gewichtszunahme von $1,3 \pm 0,7$ g auf $0,8 \pm 0,4$ g zurückgegangen.

Eine Gewichtszunahme wird auch bei tumortragenden Pfoten unter lokaler Ultraschallüberwärmung beobachtet, wobei das Ausmaß der Schwellung von der Tumorgröße abhängt. Die Veränderungen des Pfortengewichts direkt und 24 - 28 Stunden nach einer lokalen Ultraschallüberwärmung ist als Funktion des Tumorgewichtes in Abb. 28 dargestellt.

Pfoten mit im Mittel 1,4 g schweren Tumoren schwellen relativ zu ihrem Ausgangsgewicht und absolut am stärksten. Nach einer einstündigen Überwärmung bei 44°C haben sie ihr Gewicht fast verdoppelt (ΔG : $1,2 \pm 0,5$ g). Ein Tag nach der Überwärmung ist noch immer eine Schwellung zu verzeichnen, die etwa dem halben Tumorneuchgewicht entspricht (WG: $0,8 \pm 0,3$ g). Pfoten mit 2,4 g schweren Tumoren erhöhen ihr Gewicht um $0,8 \pm 0,4$ g, d.h. um etwa ein Viertel des ursprüng-

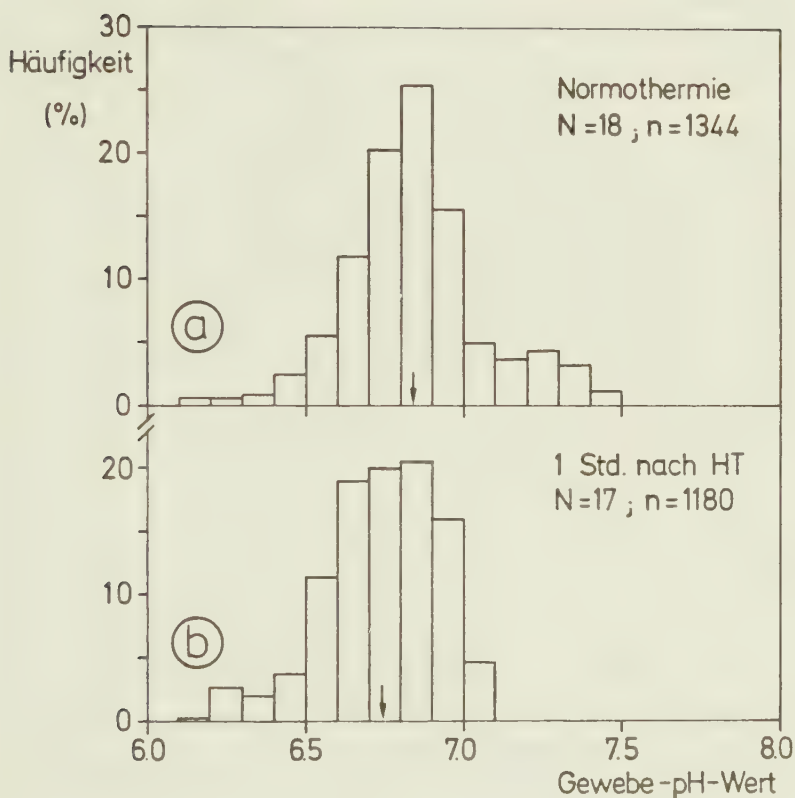


Abb.26: Häufigkeitsverteilungen der in ca. 2,9 g schweren Xenotransplantaten eines medullären menschlichen Mammakarzinoms vor (a) und 1 Stunde nach (b) einer lokalisierten Ultraschallhyperthermie (44°C, 60 min; $\Delta T/\Delta t < 0,7^\circ\text{C}/\text{min}$) gemessenen pH-Werte. Die Pfeile kennzeichnen die mittleren pH-Werte (N = Anzahl der untersuchten Tumoren, n = Anzahl der Meßwerte)

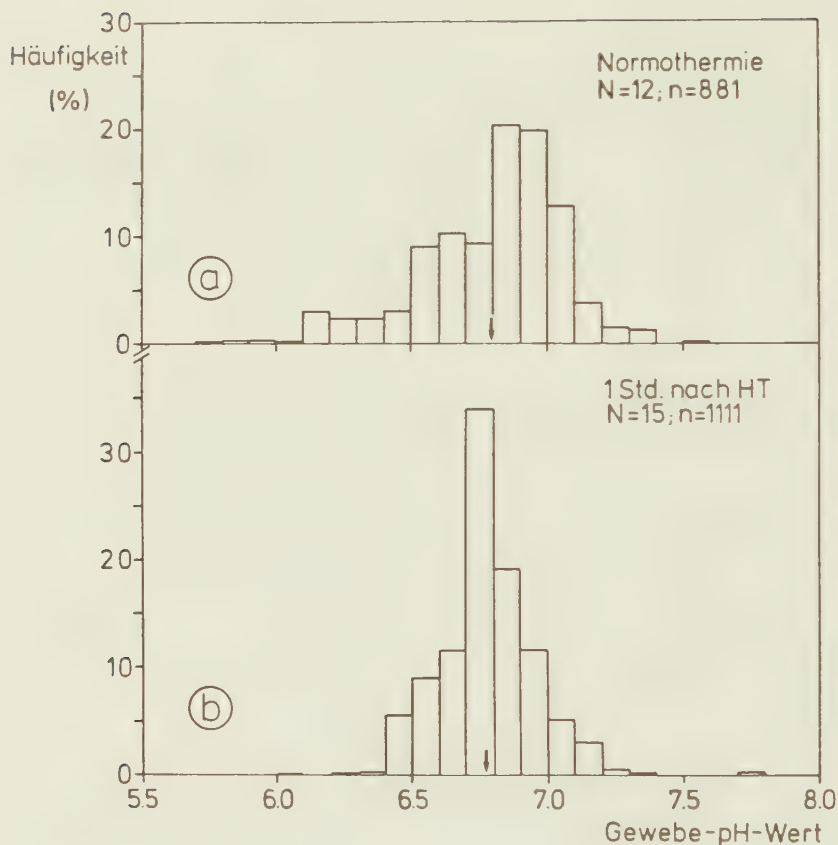


Abb.27: Häufigkeitsverteilungen der in ca. 6,8 g schweren Xenotransplantaten eines medullären menschlichen Mammakarzinoms vor (a) und 1 Stunde nach (b) einer lokalisierten Ultraschallhyperthermie (44°C, 60 min; $\Delta T/\Delta t < 0,7^\circ\text{C}/\text{min}$) gemessenen pH-Werte (N = Anzahl der untersuchten Tumoren, n = Anzahl der Meßwerte)

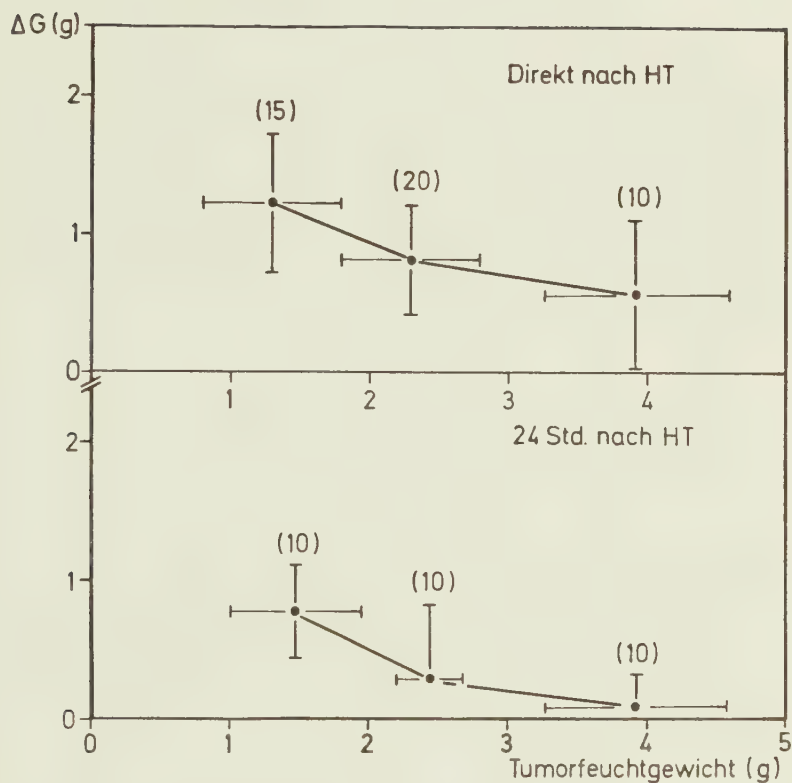


Abb.28: Veränderung des Pfotengewichtes (ΔG) nach einer lokalisierten Ultraschallüberwärmung (44°C , 60 min) als Funktion des Feuchtgewichtes der implantierten Yoshida-Sarkome. Die Zahlen in den Klammern geben die Anzahl der Meßwerte an.

lichen Tumorgewichtes. Auch diese Schwellung ist am Tage nach der Überwärmung auf die Hälfte zurückgegangen (ΔG : $0,3 \pm 0,5$ g). Pfoten mit 4 g schweren Tumoren sind direkt nach der Überwärmung $0,6 \pm 0,6$ g schwerer. Bei diesen Pfoten beträgt die Gewichtszunahme relativ ein Siebtel des Tumorgewichtes. 24 - 28 Stunden später ist die Schwellung fast vollständig zurückgegangen (ΔG : $0,1 \pm 0,2$ g). Damit ändern Rattenpfoten mit kleinen subkutanen Tumoren ihr Gewicht unter lokalisierter Ultraschallhyperthermie in demselben Maße wie tumorfreie Füße. Bei Pfoten mit großen Tumoren ist diese Veränderung absolut und relativ deutlich geringer ausgeprägt.

3.4. Veränderung systemischer Parameter unter lokaler Ultraschallhyperthermie (44°C , 60 min)

Die mittleren arteriellen Blutdrücke in den untersuchten Versuchsgruppen sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Die Veränderungen der mittleren arteriellen Blutdruckwerte von Sprague-Dawley-Ratten während einer lokalisierten Ultraschallüberwärmung (44°C , 60 min) der rechten Hinterpfote oder eines Fußrückentumors sind als Box- und Whisker-Plot in Abb. 29 graphisch dargestellt.

Es ist deutlich, daß der mittlere arterielle Blutdruck (MABP) von Sprague-Dawley-Ratten bei einer lokalen Ultraschallüberwärmung der tumorfreien oder der tumortragenden Hinterpfote während der ersten fünf Minuten im Mittel von 123 ± 17 mmHg auf 137 ± 17 mmHg ansteigt und im Laufe der nächsten 90 Minuten bis unter den Ausgangswert abfällt (MABP: 118 ± 15 mmHg). Diese Blutdruckveränderungen unter lokaler Hyperthermie sind deutlich ausgeprägt ($2 p < 0,002$). Die Veränderungen des MABP ist bei der Erwärmung tumorfreier Pfoten ähnlich ausgeprägt wie bei der Überwärmung von Tumoren. Die Erhöhung des MABP ist von der Geschwindigkeit, mit

Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichungen des mittleren arteriellen Blutdruckes (in mmHg) von tumorfreien und tumortragenden Ratten vor (VHT), zu verschiedenen Zeitpunkten während (5, 30, 55 min) und direkt nach (NHT) einer lokalisierten Ultraschallhyperthermie (44°C, 60 min) der tumorfreien Pfote oder von Tumoren (N = Anzahl der untersuchten Tiere; Erläuterungen zur Kennzeichnung der untersuchten Gruppen s. Tabelle 2)

	N	VHT (mmHg)	5 min (mmHg)	30 min (mmHg)	55 min (mmHg)	NHT (mmHg)
SD SC HT ^a	13	118 ± 21	133 ± 21	120 ± 19	120 ± 18	101 ± 20
SD Yosh HT ^a	36	125 ± 17	135 ± 17	135 ± 17	128 ± 15	123 ± 9
SD Yosh HT ^b	10	121 ± 8	139 ± 11	136 ± 8	127 ± 9	117 ± 14
NR ANA/MED HT ^b	45	126 ± 14	129 ± 15	127 ± 15	123 ± 17	129 ± 15

a = Aufheizrate $\Delta T/\Delta t > 1,5^\circ\text{C}/\text{min}$; b = Aufheizrate $\Delta T/\Delta t < 0,7^\circ\text{C}/\text{min}$

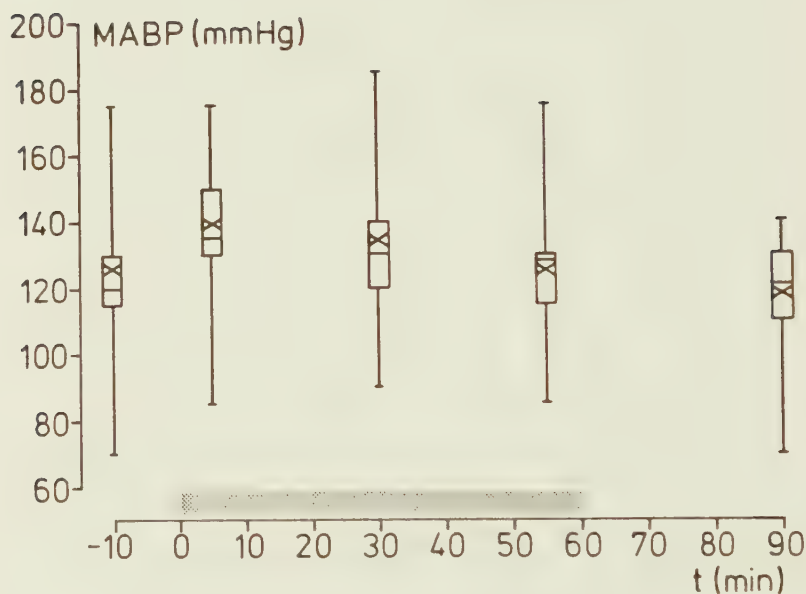


Abb.29: Box- und Whisker-Plot für den mittleren arteriellen Blutdruck (MABP) von Sprague- Dawley-Ratten vor, während und nach einer lokalisierten Ultraschall-Überwärmung (44°C, 60 min) der tumorfreen und der tumortragenden rechten Hinterpfote. Bzgl. weiterer Erläuterungen vgl. Abb. 3. Der graue Balken gibt den Zeitraum der Hyperthermiebehandlung an.

der der Tumor erwärmt wurde, unabhängig. Im Gegensatz dazu ändert sich der MABP von Nacktratten bei der Erwärmung von subkutanen Tumoren in der Milchleiste nicht.

Die Veränderung der Atemgaspartialdrücke im arteriellen Blut, des arteriellen Blut-pH-Wertes, des Hämatokritwertes und der mittleren Glukosekonzentration im arteriellen Blut sind in Tabelle 7 für 15 Sprague-Dawley-Ratten während und nach einer lokalisierten Hyperthermiebehandlung von ca. 2,4 g schweren Yoshida-Sarkomen zusammengestellt. Die Veränderungen der Glukosekonzentrationen im arteriellen Blut dieser Ratten während und nach einer lokalisierten Ultraschallüberwärmung der Fußrückentumoren sind als sog. Box- und Whisker-Plot in Abb. 30 graphisch dargestellt.

Unter der lokalen Überwärmung ändert sich im Mittel der Atemgasstatus der Tiere nicht. Bei einzelnen Ratten wird allerdings eine leichte respiratorische Alkalose mit erhöhtem O_2 - und erniedrigtem CO_2 -Partialdrücken beobachtet. Der Hämatokritwert im arteriellen Blut erhöht sich während der Hyperthermie von $0,44 \pm 0,03$ auf $0,48 \pm 0,06$. Gleichzeitig steigt die mittlere Glukosekonzentration im Plasma des arteriellen Blutes von 95 ± 7 mg/dl auf 102 ± 14 mg/dl an. Diese Veränderungen sind deutlich ausgeprägt ($2p < 0,05$).

Bezüglich des Atemgasstatus und des Hämatokritwertes verhalten sich die übrigen verwendeten Sprague-Dawley-Ratten und die untersuchten Nacktratten ähnlich. Hingegen ändern sich die arteriellen Glukosekonzentrationen der Nacktratten im Mittel nur geringfügig.

Die Rektaltemperatur der verwendeten Tiere lag zu Beginn der Hyperthermie in der Regel zwischen 37,0 und 37,5°C. Während der Überwärmung erhöhte sie sich im Mittel um weniger als 1°C.

Tabelle 7: Parameter des Atemgaswechsels und mittlere Glukosekonzentrationen im arteriellen Blut von 15 Sprague-Dawley-Ratten vor (VHT), während (WHT) und zu verschiedenen Zeiten nach (2, 90, 150 min) der lokalen Ultraschallüberwärmung (44°C, 60 min) von ca 2,4 g schweren Yoshida-Sarkomen, subkutan isotransplantiert in den Fußrücken der Ratten (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

	VHT	WHT	2 min	90 min	150 min
PO ₂ (mmHg)	86 $\pm$ 6	83 $\pm$ 5	84 $\pm$ 5	83 $\pm$ 4	83 $\pm$ 3
pCO ₂ (mmHg)	42 $\pm$ 4	36 $\pm$ 4	36 $\pm$ 5	36 $\pm$ 5	35 $\pm$ 6
pH	7,39 $\pm$ 0,04	7,41 $\pm$ 0,03	7,39 $\pm$ 0,04	7,39 $\pm$ 0,05	7,38 $\pm$ 0,04
SO ₂ (%)	97 $\pm$ 1	97 $\pm$ 1	97 $\pm$ 1	97 $\pm$ 2	97 $\pm$ 2
HKT (v/v)	0,44 $\pm$ 0,03	0,48 $\pm$ 0,06	0,48 $\pm$ 0,06	0,47 $\pm$ 0,07	0,45 $\pm$ 0,05
[Glukose] (mg/dl)	95 $\pm$ 7	98 $\pm$ 11	102 $\pm$ 14	102 $\pm$ 7	94 $\pm$ 8

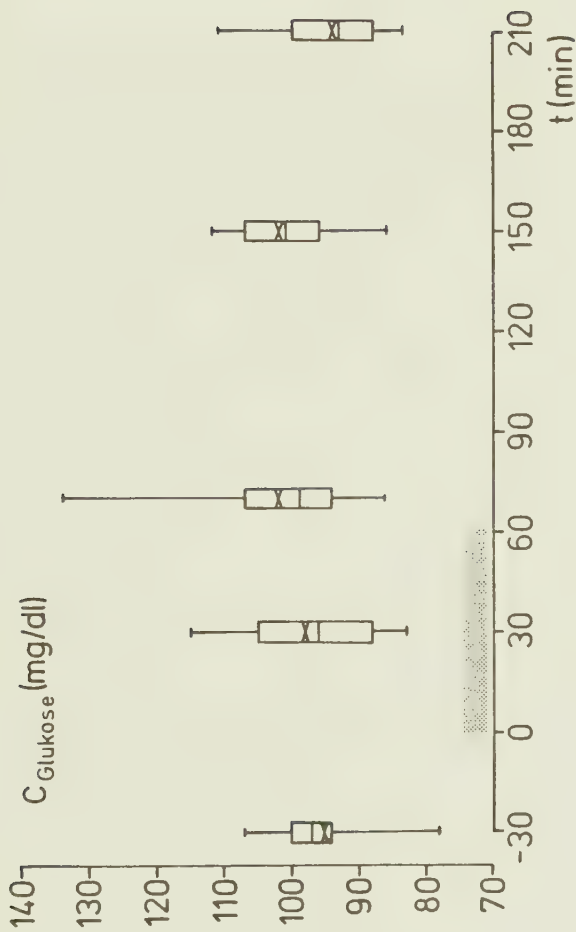


Abb.30: Box- und Whisker-Plot für die arteriellen Glukosekonzentrationen (C_{Glukose}) von Sprague-Dawley-Ratten mit ca. 2,4 g schweren Yoshida-Sarkomen zu verschiedenen Zeitpunkten vor, während und nach einer lokalisierten Ultraschallüberwärmung (44°C , 60 min) der Tumoren. Bzgl. weiterer Erläuterungen vgl. Abb.3. Der graue Balken gibt den Zeitraum der Hyperthermiebehandlung an.

4. DISKUSSION

4.1. Diskussion der Methoden

4.1.1. Wahl der verwendeten Tumoren

Die thymusplastische immune Ratte trat erstmalig 1953 in einem Ratten-Inzuchtstamm am Rowett Research Institut in Aberdeen auf. Eine Aufzucht homozygoter Ratten gelang damals jedoch nicht. Erst 1975 konnte unter verbesserten hygienischen Verhältnissen und bei besserer Kenntnis der besonderen Erfordernisse immungeschwächter Tiere nach erneutem Auftreten der Mutante eine Zucht etabliert werden (FESTING et al., 1978; zusammenfassende Darstellung s. EASTERT et al., 1981). Die Xenotransplantation menschlichen Tumorgewebes auf solche Ratten ermöglicht erstmalig die systematische Untersuchung menschlichen Tumormaterials in situ unter kontrollierten systemischen Bedingungen. Wahrscheinlich liefert das Modell Ergebnisse, die zwanglos auf Tumoren des Menschen übertragen werden können (für eine Übersicht s. FOGH und GIOVANELLA, 1978). So behalten Zellen menschlicher Tumoren während der Passage in Nacktmäusen ihre spezifischen Eigenschaften und Identifikationsmerkmale weitestgehend bei (FOGH et al., 1978; TILGEN et al., 1983). Das in den Xenotransplantaten ausgebildete Vaskularisationsmuster zeigt eine große Ähnlichkeit mit dem der Primärtumoren im Menschen (OUTZEN und CUSTER, 1975; SOLESVIK et al., 1982; KRAUS et al., 1983). Weiter sind die bislang an xenotransplantierten Tumoren erhobenen pathophysiologischen Befunde mit den in Tumoren in Patienten gemessenen gut vergleichbar (KALLINOWSKI et al., 1985a; VAUPEL et al., 1985b).

Der klinische Verlauf ist bei den Patientinnen, die an den untersuchten Mammakarzinomen erkrankt waren, genau dokumentiert. Zum histologischen Verhalten der xenotransplantierten Karzinome ist zu sagen, daß sie Volumenverdoppelungszei-

ten von 5 - 6 Tagen aufweisen (VAUPEL et al., 1985b) und Hormonrezeptor-negativ sind (FORTMEYER, persönliche Mitteilung).

Das Yoshida-Sarkom wurde für die vorliegende Untersuchung ausgewählt, weil es in der experimentellen Onkologie häufig verwendet wird. Das Sarkom war 1943 multifokal in der Bauchhöhle einer Albino-Ratte entstanden, die zunächst für drei Monate mit 4-Amino-2,3-dimethyl-amino-azobenzol gefüttert worden war und der anschließend dreimal wöchentlich mit einer Lösung von Kaliumarsenit die Rückenhaut bepinselt wurde (SCHMÄHL, 1980). Es stellt einen isotransplantierbaren Nagetiertumor dar. Zwar konnte bislang weder die Stammzelllinie noch die histologische Einordnung eindeutig festgelegt werden, jedoch ist das biologische Verhalten des Tumors intensiv untersucht worden. So beträgt die Volumenverdopplungszeit eines 1,5 g schweren Tumors etwa 1,5 Tage, die eines 3,5 g schweren Tumors hingegen etwa 6 Tage. Als Besonderheit bei isotransplantierten Nagetiertumoren neigt das Yoshida-Sarkom zur Metastasierung, die jedoch nicht vor dem 15. Tag auftritt. Darüber hinaus sind Yoshida-Sarkome schwach immunogen (DICKSON und ELLIS, 1976). Bisher wurde das Yoshida-Sarkom häufig für die präklinische Prüfung der therapeutischen Wirksamkeit neuer Chemotherapeutika (DICKSON und SUZANGAR, 1974; SCHMÄHL, 1980) und für Hyperthermiestudien (DICKSON und SUZANGAR, 1974; DICKSON und ELLIS, 1976; DICKSON und CALDERWOOD, 1979; 1983) eingesetzt, wobei bei letzteren allerdings nur Temperaturen unterhalb 42°C gewählt wurden. Systematische Untersuchungen der Hyperthermiwirkung bei Temperaturen oberhalb 42°C liegen hingegen nicht vor.

Die Verwendung spontaner Nagetiertumoren für pathophysiologische Untersuchungen wird durch die hohe biologische Variabilität der zur Verfügung stehenden Tumoren stark eingeschränkt. Vor allem sind diese Tumoren wegen der unsystematischen Lokalisation und der variablen Wachstumsverhält-

nisse für viele Untersuchungen nicht verwendbar. Daher spielen sie bislang für systematische Untersuchung pathophysiologischer Probleme maligner Tumoren eine untergeordnete Rolle.

Vergleichend zu den Tumoren wurden die Subkutis und die Skelettmuskulatur der Ratte untersucht, da pH-Messungen in unverändertem Brustdrüsengewebe aus technischen Gründen bei der Ratte nur schwer durchführbar sind. Die Subkutis wurde als Referenzgewebe gewählt, da die Brustdrüse ein Anhangsgebilde der Haut darstellt. Weiterhin bilden die Subkutis und die Skelettmuskulatur die Gewebe am Ort der Tumorentstehung bzw. der Tumorumplantation. Auch werden sie am häufigsten von einem eventuellen infiltrativen Wachstum der Tumoren erfaßt.

Der verwendete Tumorträger, die Ratte, eignet sich für die Überwachung vitaler Parameter während der Experimente. Dies ist bei Untersuchungen, bei denen die Maus als Tumorträger dient, nicht möglich.

4.1.2. Wahl des Hyperthermieverfahrens

Die in der Patientenbehandlung angewandten Hyperthermieverfahren lassen sich in zwei große Gruppen einteilen: Ganzkörperhyperthermie und lokale Überwärmungsbehandlung. Bei der Ganzkörperhyperthermie werden Temperaturen bis 41,8 - 42,0°C systemisch für mehrere Stunden aufrechterhalten. Demgegenüber werden bei der lokalen Überwärmungsbehandlung Tumortemperaturen bis zu 45°C angestrebt.

Eine Vielzahl von Hyperthermiemethoden steht für die lokale Überwärmung zur Verfügung. Detaillierte Übersichten zu dem relativen Nutzen bzw. den Vor- und Nachteilen der einzelnen Methoden finden sich bei DIETZEL (1975), JAIN und

GULLINO (1980), HAND und HAAR (1981), HAHN (1982), NUSSBAUM (1982), STORM (1983), HORNBACH (1984) und LELE (1985). Die gebräuchlichsten Hyperthermieverfahren sind in Tabelle 8 kurz charakterisiert.

Die einfachste, kostengünstigste und historisch älteste Hyperthermiemethode ist das Eintauchen eines Körperteils in ein Wasserbad. Beim Menschen ist die Anwendung dieses Verfahrens jedoch auf oberflächliche Tumoren, Akren bzw. Extremitäten beschränkt. Häufig muß sogar in Blutleere gearbeitet werden, um adäquate Hyperthermietemperaturen zu erreichen. Auch die isolierte Perfusion von Organen (z.B. Leber oder Niere) oder von Extremitäten mit hyperthermen Lösungen ist in ihrer Anwendung naturgemäß eingeschränkt.

Die Methoden, die z.Zt. klinisch am häufigsten verwendet werde, beruhen auf Hyperthermieverfahren unter Anwendung von Radiowellen, Mikrowellen und Ultraschall. Dabei bietet die Ultraschallanwendung die Vorteile, gut auf ein Gewebevolumen fokussierbar und lokalisierbar zu sein. Unter Fokussierbarkeit versteht man in diesem Zusammenhang, daß ein Wärmefeld mit einem Temperaturmaximum aufgebaut werden kann. Diese Fokusbildung ist mit einem singulären Applikator durch eine konvergierende Energieabstrahlung oder mit einem Mehrfachapplikatorsystem, z.B. mit einem sog. Kreuzfeuerapplikator, erreichbar. Die Lokalisierbarkeit gibt hingegen an, ob und wie präzise der Ort der Überwärmung zu wählen ist. Auch in diesem Punkt bietet die Ultraschallanwendung Vorteile gegenüber sowohl Mikrowellen als auch Radiowellen, vor allem bei tiefergelegenen Tumoren.

Für eine gezielte Gewebeüberwärmung ist eine adäquate Thermometrie eine conditio sine qua non. Die Temperaturmessung wird üblicherweise invasiv mit Thermoelementen durchgeführt. Diese Temperaturmessung wird durch die Ultraschallüberwärmung im Gegensatz zu anderen Verfahren nur wenig

Tabelle 12

Therapiealternativen von Verfahren zur Lokalisation von Hyperthermieerkrankungen (modifiziert nach Hatt und Hatt, 1985, 1987)

Prinzip	Massenbad	Isolierte Perfusion	Radiotherapie				Mikrowellen		Ultraschall
Freiquant (MHz)			0,5 - 1		10 - 30		360 - 1000	> 1000	0,5 - 5
Technik	Einleuchten in hypertherme(n) Lösungen	Perfusion v. Organen mit	Metall- implantate	lokalisierte Stromfelder	kathodische Ankopplung	induktive Ankopplung	1. Strahlungsquellen ohne direkten Hautkontakt 2. Kontaktopplikatoren 3. Koaxialapplikatoren		1. Direkte Ankopplung 2. Behandlung über eine Massenvorlaufstrecke
Lokalisier- barkeit	sehr gut	sehr gut	gut	gut	schlecht	mäßig	1. Strahlungsquellen: schlecht 2. Kontaktopplikatoren: mäßig 3. Koaxiale Applikatoren: gut		sehr gut
Fokussier- barkeit	nicht möglich	nicht möglich	nicht möglich	nicht möglich	nicht möglich	nicht möglich	schlecht	mäßig	sehr gut
Thermometrie	gut	gut	schlecht	schlecht	schlecht	schlecht	schlecht	mäßig	gut
Kontraindi- kationen	periphere Gefäßerkrankung	Koagulopathien	Herzschrittmacher				Herzschrittmacher		Schwangerschaft

gestört. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Untersuchung Ultraschall als Hyperthermiemethode eingesetzt. Der wesentlichste Nachteil der Ultraschallanwendung liegt in der nahezu vollständigen Reflexion des Ultraschalles an Gewebe-Knochen-Grenzen. Eine solche Reflexion könnte zu der Ausbildung eines inhomogenen Temperaturfeldes in den untersuchten Yoshida-Sarkomen führen. Durch sorgfältige Lagerungstechnik kann man diesen Nachteil weitestgehend ausschalten, was durch die Messung der Temperaturverteilung in Yoshida-Sarkomen bestätigt wurde (BLENDSTRUP et al., 1985).

4.1.3. Methodik der pH-Messung

Eine Vielzahl von nicht-invasiven und invasiven Verfahren wurden für die Messung des Tumor-Gewebe- pH-Wertes eingesetzt. Während nicht-invasive Meßmethoden zur Zeit nur geeignet sind, integrierte Werte über größere Tumorbezirke zu erfassen, ist es mit invasiven Methoden möglich, pH-Verteilungen im Tumorgewebe zu messen.

Eine sehr elegante Methode zur Gewinnung von interstitieller Flüssigkeit aus dem Tumorgewebe stellten GULLINO et al. (1965) vor, um nicht-invasiv die Veränderungen des pH-Wertes in Tumoren verlässlich registrieren zu können. Dabei wächst der Tumor um eine poröse Kammer, in der sich Flüssigkeit sammelt, von der angenommen wird, daß sie im Äquilibrium mit dem Tumorinterstitium steht. Da die Probennahme mehrfach möglich ist, kann die Veränderung der Zusammensetzung der interstitiellen Flüssigkeit z.B. mit fortschreitendem Tumorstadium oder als Reaktion auf veränderte Randbedingungen beobachtet werden (JAIN et al., 1984). Bei einem Kammer-volumen von 0,3 ml und einem Kammerdurchmesser von 14 mm ist allerdings nur eine integrierende Messung in einem Tumorvolumen von ca. 1 Kubikzentimeter möglich. Der Einfluß der

Kammer auf das Mikromilieu des Tumors und die Tumorzellen ist unbekannt.

Die Veränderung des interstitiellen pH-Wertes während des Tumorwachstums kann auch mittels einer implantierten Glas-pH-Elektrode ($\varnothing$: 7,6 mm) erfaßt werden (HINSULL et al., 1984). Das Auflösungsvermögen dieser Methode liegt ebenfalls im Bereich von Kubikzentimetern.

Eine weitere, nicht-invasive Möglichkeit zur Messung des Tumor-Gewebe-pH-Wertes stellt die Nuklear-Magnetische Resonanz (NMR) dar, die in den letzten Jahren auch in der Tumorforschung zum Einsatz gelangte (für zusammenfassende Darstellungen s. SHULMAN et al., 1985; GRIFFITHS et al., 1981; BALABAN, 1984; EVANOCHKO et al., 1985). Mit dieser Methode ist es möglich, am soliden Tumor in vivo nicht-invasiv sowohl den Gewebe-pH-Wert als auch Stoffwechselveränderungen zu beobachten. Allerdings können auch mit diesem Verfahren aufgrund eines Auflösungsvermögens im Kubikzentimeterbereich bislang nur integrierende Messungen über ein größeres Tumolvolumen vorgenommen werden. Da außerdem enorm hohe Investitionskosten momentan noch einer weiteren Verbreitung dieser Meßmöglichkeit entgegenstehen, wurde über die NMR-Anwendung nur an Hand von illustrativen Einzelfällen berichtet. Dabei zeichnet sich als interessante zukünftige Anwendungsmöglichkeit die Messung des intrazellulären neben der des extrazellulären pH-Wertes ab. Die Methode scheint valide zu sein, da intrazelluläre Vergleichsmessungen mit Glaselektroden und ^{31}P -NMR nahezu identische Werte ergaben (NUCCITELLI et al., 1981; GADIAN et al., 1982).

pH-Verteilungen im Tumorgewebe können mit Einstichelektroden gemessen werden. Da Messungen mit Einstichelektroden eine invasive Methode darstellen, ist eine Traumatisierung des Gewebes zu erwarten. Infolgedessen sind wiederholte Messungen schwer durchzuführen. Wegen der Gewebeerstörung

stellt der mit Einstichelektroden erhaltene Meßwert eine "Mischung" aus intrazellulärem, interstitiellem und intravasalem pH-Wert dar. Aufgrund des relativ großen interstitiellen Raumes in Tumoren (GULLINO, 1975; VAUPEL und HAMMERSEN, 1983) ist jedoch davon auszugehen, daß der gemessene Wert im wesentlichen den interstitiellen pH-Wert repräsentiert.

Das Ausmaß der durch das Verschieben der Elektrode verursachten Gewebezerstörung steigt mit zunehmendem Durchmesser der Elektrodenspitze an. Offensichtlich wird aber die Gewebetraumatisierung durch die pH-Messung überschätzt, da bei der Anfertigung von Gefäßausgüssen bei einer liegenden Elektrode mit einem Durchmesser von 2,1 mm überraschend keine größeren Blutungen gefunden werden konnten (WIKE-HOOLLEY et al., 1985). Trotzdem sind, vor allem für den Einsatz in Multielektrodensystemen, die der detaillierten Untersuchung ausgewählter Probleme der Mikrozirkulation am definierten Modell dienen, Elektroden mit möglichst kleinem Spitzendurchmesser zu wählen. Nur mit solchen Elektroden gelingt die räumliche Auflösung bis in kleinste Bereiche der Mikrozirkulation. Unter bestimmten experimentellen Bedingungen sind sogar intrazelluläre pH-Messungen möglich. Solche Elektroden sind aber in der Regel mechanisch sehr instabil und ermöglichen deshalb nur eine limitierte Anzahl von Experimenten. Elektroden mit größerem Spitzendurchmesser und einem entsprechend größeren Einzugsbereich hingegen "integrieren" den Meßwert über ein größeres Volumen. Sie geben damit eher den in einem Gewebeareal herrschenden mittleren pH-Wert wieder, den Elektroden mit Spitzendurchmessern kleiner 5 μm nur mit einer sehr viel höheren Anzahl von Meßpunkten verläßlich aufnehmen können. Das bedeutet jedoch, daß bei ausreichender Anzahl von Meßwerten Elektroden mit kleinen und mit großen Spitzendurchmessern denselben mittleren Tumorgewebe-pH-Wert messen, was auch aus den Arbeiten von SONG et al. (1980a) und RHEE et al. (1984) gefolgert werden kann.

Größere Elektroden sind jedoch notwendigerweise robuster und zumindest aus technischer Sicht für die pH-Messung in Tumoren in Patienten prinzipiell geeignet (THISTLETHWAITE et al., 1984; WIKE-HOOLEY et al., 1985).

Die Glas-pH-Elektrode hat sich seit ihrer ersten Anwendung durch VOEGTLIN und KAHLER (1932) den anderen invasiven Methoden als überlegen erwiesen und stellt heute die Methode der Wahl für die Erfassung von Gewebe-pH-Verteilungen in vivo dar. Aus diesen Gründen wurde für die vorliegende Arbeit eine miniaturisierte Glas-pH-Elektrode gewählt.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. pH-Verteilungen in Skelettmuskulatur und Subkutis unter Normothermie

In Tabelle 9 sind die mittleren pH-Werte in der Skelettmuskulatur und in Tabelle 10 die mittleren pH-Werte in der Subkutis vergleichend zu Angaben in der relevanten Literatur (nach Spezies getrennt) zusammengestellt.

Die in der vorliegenden Arbeit in der Skelettmuskulatur (s. Abb. 4) und in subkutanem Gewebe (s. Abb. 5) gefundenen mittleren pH-Werte sind mit vielen in der Literatur berichteten Daten gut vergleichbar. Diese liegen in der Regel und unabhängig von der untersuchten Spezies um pH 7,4, dem pH-Wert des arteriellen Blutes bei 37°C.

Abweichend hiervon berichteten PARTRIDGE et al. (1934) (Skelettmuskulatur der Ratte), MEYER et al. (1948) (Subkutis und Skelettmuskulatur des Menschen) und INCH (1954) (Subkutis des Menschen) über mittlere pH-Werte unter 7,0.

Die Befunde von PARTRIDGE et al. (1934) wurden an homogenisiertem Gewebe erhoben, wohingegen MEYER et al. (1949)

Tabelle 9: pH-Werte in der Skelettmuskulatur

mittlerer pH-Wert	pH-Bereich	Autoren

Spezies: M A U S		

	7,1 -7,4	SONG et al., 1980a
7,31	7,12-7,37	VAUPEL et al., 1981
7,46		RHEE et al., 1984
7,50		RHEE et al., 1985

Spezies: R A T T E		

6,85	6,70-6,99	PARTRIDGE et al., 1934
7,55	7,50-7,60	VOEGTLIN et al., 1935
7,47		RAUEN et al., 1967
7,40		EDEN et al., 1955
7,48		KAHLER und MOORE, 1962
	7,25-7,40	GEBERT und FRIEDMAN, 1973
	7,05-7,30	DICKSON und CALDERWOOD, 1979
7,59	7,20-8,06	van den BERG et al., 1982
7,21		DICKSON und CALDERWOOD, 1983
7,25	6,77-7,54	vorliegende Arbeit

Spezies: M E N S C H		

6,47	5,24-7,20	MEYER et al., 1948
7,64	7,30-7,81	NAESLUND und SWENSON, 1953
7,38	7,30-7,48	COUCH et al., 1971
7,37	7,32-7,47	O'DONNELL, 1975

Tabelle 10: pH-Werte in subkutanem Gewebe

mittlerer pH-Wert	pH-Bereich	Autoren

Spezies: M A U S		

	7,0 -7,2	TAGASHIRA et al., 1953
7,44	7,19-7,90	NAESLUND und SWENSON, 1953
7,31	7,12-7,37	VAUPEL et al., 1981

Spezies: R A T T E		

7,20		VOEGTLIN et al., 1935
	6,95-7,05	TAGASHIRA et al., 1953
7,34		GULLINO et al., 1965
7,50		HINSULL et al., 1984
7,30		JAIN et al., 1984
7,32	7,05-7,59	vorliegende Arbeit; SD-Ratte
7,26	6,97-7,95	vorliegende Arbeit; rnu/rnu-Ratte

Spezies: M E N S C H		

6,70	6,31-7,10	MEYER et al., 1948
7,65	7,30-8,00	NAESLUND und SWENSON, 1953
	4,9 -6,2	INCH, 1954
7,43	7,30-7,54	ASHBY, 1966
7,42		STAMM et al., 1976
7,33		VIDYASAGAR et al., 1979
7,54		HARRISON und WALKER, 1979
7,63	7,36-8,03	van den BERG et al., 1982
7,54		WIKE-HOOLEY et al., 1985

an exzidierten Operationspräparaten Gewebe-pH-Werte bestimmten. Beide Untersuchungen wurden damit unter artifiziellen Randbedingungen durchgeführt und die damit gefundene starke Verschiebung des mittleren Gewebe-pH-Wertes gegenüber dem pH-Wert des arteriellen Blutes zu niedrigeren Werten ist zu erwarten. INCH (1954) verwendet eine Technik, bei der die Elektrode mit der angefeuchteten Haut oder Hautläsion über eine Kontaktlösung mit pH 6,7 in Kontakt gebracht wird. Eine methodisch einwandfreie Messung des absoluten pH-Wertes ist unter diesen Bedingungen nicht gewährleistet.

In der Subkutis des Menschen fanden NAESLUND und SWENSON (1953), HARRISON und WALKER (1979), van den BERG et al. (1982) und WIKE-HOOLEY et al. (1985) eine Erhöhung des mittleren Gewebe-pH-Wertes gegenüber dem mittleren pH-Wert des arteriellen Blutes. Eine gleichsinnige Veränderung fanden van den BERG et al. (1982) in der Muskulatur der Ratte.

Zur Abklärung letzterer Ergebnisse wurden unter kontrollierten Randbedingungen Vergleichsmessungen zwischen dem in der vorliegenden Arbeit und dem von der Arbeitsgruppe um REINHOLD (van den BERG et al., 1982; WIKE-HOOLEY et al., 1984b) verwendeten Elektrodentyp durchgeführt. An dem selben Tier unter identischen Meßbedingungen werden mit beiden Elektroden vergleichbare Ergebnisse erhalten, die den in der vorliegenden Arbeit berichteten entsprechen. Die Abweichungen zwischen den Ergebnisse beider Arbeitsgruppen sind damit nicht durch technische, bzw. apparative Unterschiede erklärbar (vgl. auch WIKE-HOOLEY et al., 1985).

Temperatureinflüsse und CO_2 -Verluste aus dem Gewebe müssen bei den pH-Messungen soweit wie möglich berücksichtigt bzw. vermieden werden. Unterschiedliche Kalibrier- und Meßtemperaturen, wie von van den BERG et al. (1982) angegeben, führen zu Veränderungen der Meßwerte, die in komplexen Systemen aufgrund von Unterschieden in den Dissoziationskon-

stanten einzelner Komponenten nicht vorhergesagt werden können (SOBER, 1970). Für Plasma und Blut (STADIE und MARTIN, 1924; ROSENTHAL, 1948; ADAMSONS et al., 1964; RAHN et al., 1974; REEVES, 1976) und für menschliche Subkutis (HARRISON und WALKER, 1979) wurden solche pH-Veränderungen beschrieben. Der Temperaturkoeffizient für die menschliche Subkutis beträgt $0,023 \pm 0,007$ pH-Einheiten pro °C, wobei eine Temperaturerniedrigung zu einer Alkalisierung des Gewebes führt. Eine Temperaturdifferenz von 4 - 8°C zwischen den verschiedenen zur Messung verwendeten Geweben unter den jeweils gewählten experimentellen Bedingungen würden den Unterschied zwischen den berichteten pH-Werten zwanglos erklären. Weiterhin ist zu beachten, daß nach der Nernst'schen Gleichung Elektrodenpotentiale temperaturabhängig sind. Eine Temperaturabnahme führt zu einer Abnahme des Elektrodenpotentials. Der Vorgang der Messung kann aber auch direkt den gemessenen pH-Wert beeinflussen. Zum einen können grobe Gewebeerstörungen zu einer Absenkung der gemessenen pH-Werte führen. Zum anderen kann eine breitflächige Eröffnung des Gewebes einen lokalen CO₂-Verlust mit einem nachfolgenden pH-Anstieg bedingen.

4.2.2. pH-Verteilungen in Tumoren bei Normothermie

In Tabelle 11-13 sind die relevanten pH-Werte in Tumoren - nach Spezies getrennt - vergleichend zu Angaben in der Literatur zusammengestellt.

Der mittlere pH-Wert in den untersuchten Tumoren liegt 0,4 - 0,6 pH-Einheiten niedriger als der entsprechende pH-Wert am Ort der Implantation oder Entstehung. 70% der in weitgehend vitalem Tumorgewebe gemessenen pH-Werte liegen unter pH 7,0. Dies gilt für maligne Spontantumoren ebenso wie für einen isotransplantierten Nagetiertumor und Xenotransplantate menschlicher Tumoren (s. Abb. 6-12). Diese Be-

funde werden durch eine Vielzahl von Messungen anderer Arbeitsgruppen in verschiedensten Tumoren in unterschiedlichen Spezies bestätigt (s. Tabelle 11-13). Insbesondere stimmen die in xenotransplantierten menschlichen Mammakarzinomen gemessenen pH-Verteilungen sehr gut mit den Befunden in verschiedenen menschlichen Tumoren (einschließlich Mammakarzinomen) überein. Die Befunde der Rotterdamer Arbeitsgruppe (van den BERG et al., 1982; WIKE-HOOLEY et al., 1984, 1985) liegen mit einem mittleren pH-Wert von 7,25 jedoch etwa 0,3 pH-Einheiten höher als die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der übrigen Gruppen. Bei ersteren Untersuchungen scheinen die Messungen in Subkutis, Skelettmuskulatur und Tumoren derselben systematischen Verschiebung zu unterliegen, so daß auch bei den Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe eine Differenz von 0,4 pH-Einheiten im mittleren pH-Wert zwischen dem Gewebe am Ort der Tumorentstehung und den Tumoren resultiert (mögliche Einflüsse auf die Absolutwerte sind in Kapitel 4.2.1. diskutiert).

Die Tumorazidose entsteht aufgrund schwerwiegender struktureller und funktioneller Abnormitäten der Mikrozirkulation in malignen Tumoren und aufgrund der hohen Glykolyse-rate der Tumorzellen. Während des fortschreitenden Tumorzustands treten in vielen malignen Tumoren charakteristische Veränderungen des Vaskularisationsmusters auf (zusammenfassende Darstellung s. VAUPEL et al., 1981), die zu inhomogen verteilten, schwerwiegenden Beeinträchtigungen des konvektiven und diffusiven Antransports von Sauerstoff und von Substraten des Energie- und Baustoffwechsels und zu Behinderungen des Abtransports von Stoffwechselprodukten wie CO_2 , Milchsäure und Ketonkörpern führen (VAUPEL, 1974; GULLINO, 1975; VAUPEL und HAMMERSEN, 1983). Diese Befunde wurden im wesentlichen an isotransplantierten Nagetiertumoren erhoben. Jedoch wurde auch für xenotransplantierte menschliche Mammakarzinome eine Abnahme der gewichtsbezogenen Durchblutung mit zunehmenden Tumorgewicht nachgewiesen

Tabelle 11: Gewebe-pH-Werte in malignen Tumoren der Maus

Tumoren	Methode	pH-Bereich	pH-Mittelwert	Bemerkungen	Literatur
Karzinom und Sarkom	Indikatorfarbstoffe		6,6		HARDE und DANYSZ-MICHEL, 1926
Karzinom	Indikatorfarbstoffe		6,6		HARDE und HENRI, 1927a, b
Adenokarzinom	Indikatorfarbstoffe	6,85-7,00			MAGATH, 1929
Ehrlich Karz. Sarkom	Chinhydron-elektrode	7,41-7,76 7,30-7,79 7,62-7,91	7,58 7,56 7,79	verstärkte Alkalose in nekrotischem Gewebe	GOLDFEDER, 1929
Karzinom	Wasserstoff-elektrode Indikator-stoffe	7,18-7,32 7,35-7,46 7,1 - 7,4 7,3 - 7,6	7,23 7,41 7,21 7,49	vital Nekrose vital Nekrose	JOOS, 1930
Ehrlich Karz.	Chinhydronelek.	6,00-7,56	6,60		OKUNEFF, 1933
Karzinom	Glaselektrode	7,24-7,54	7,39		GOLDFEDER et al., 1934
Mammakarzinom	Glaselektrode	6,82-6,90			VOEGTILIN et al., 1935
Ehrlich Karz.	Indikatorfarbstoffe	6,0 - 8,4			SEEGER, 1939
Hepatom	Glaselektrode	6,54-6,93	6,74		KAHLER und ROBERTSON, 1943
Chem.induz. Peritonealtu.	Glaselektrode	6,6 - 7,3	6,91	syst. Hyperglykämie	NAESLUND und SWENSON, 1953
Adenokarz.	Glaselektrode		6,25		TAGASHIRA et al., 1953
Ehrlich Karz.		6,55-6,65			TAGASHIRA et al., 1954
SCK Tumor WALKER 256 Ca.	Glaselektrode		7,05 7,00	Einzelmessung	SONG et al., 1980a
C3H Mammakarz.	Glaselektrode	5,8 - 7,2	6,73	Alkalose in Nekrosen	VAUPEL et al., 1981
16/C Mamma. ³¹ P-NMR		6,8 - 7,4	7,07	Azidose verstärkt mit ansteigendem Tumorgewicht	EVANOCHKO et al., 1983
SCK Tumor	Glaselektrode	6,60-7,38	6,96		RHEE et al., 1984
RIF I Tumor	Glaselektrode		7,1		RHEE et al., 1985
FSa II Tumor			7,05 6,96 6,92	Tumordurchmesser: 4-6 mm 6-8 mm 8-10 mm	

Tabelle 12: Gewebe-pH-Werte in malignen Tumoren der Ratte

Tumoren	Methode	pH-Bereich	pH-Mittelwert	Bemerkungen	Literatur
Sarkom 10	Chinhydron-elektrode	6,90-7,33		Messung in einem Gewebeextrakt	MAXWELL und BISCHOFF, 1930
Flexner-Jobling Karzinom	Glaselektrode	7,29-7,41	7,36	Messung in einem Gewebeextrakt	GOLDFEDER et al., 1934
Jensen Sarkom Flexner-Jobling Karzinom	Chinhydron-elektrode	7,11-7,52	7,37 7,44	Messung am exzidierten Gewebe	BENETATO, 1934
Jensen Sarkom Flexner-Jobling WALKER 325 Tu.	Glaselektrode	6,92-7,30 7,01-7,21	7,07 7,14 7,25	Nekrose ist weniger sauer	VOEGTLIN et al., 1935
Hepatom	Glaselektrode	6,72-7,22	6,99	Kein Unterschied vital vs. nekrotisch	KAHLER und ROBERTSON, 1943
Sarkome	Glaselektrode	6,55-7,00			TAGASHIRA et al., 1953
Hepatom			6,70		TAGASHIRA et al., 1954
Sarkome Hepatome Karzinom	Glaselektrode	6,2 - 7,6	6,98 7,00 7,00		EDEN et al., 1955
Sarkome	Glaselektrode	6,3 - 6,8			SCHEID und KUNZE, 1962
Lymphosarkom	Glaselektrode		6,93	verstärkte Azidose mit zunehmendem Tumoralter	KAHLER und MOORE, 1962
WALKER 256 Ca. Fibrosarkom Hepatome	Sammlung interstitieller Flüssigkeit	6,95-7,19	7,00 7,04 7,06		GULLINO et al., 1965
DS-Carcinosarkom	Glaselektrode	6,1 - 7,1	6,96		RAUEN et al., 1968
Walker Karz.	Glaselektrode	6,90-7,15			v. ARDENNE und REITNAUER, 1976
DS-Carcinosarkom	Glaselektrode	6,80-7,52	7,15		v. ARDENNE und REITNAUER, 1979
Yoshida-Sarkom	Glaselektrode		7,17		DICKSON und CALDERWOOD, 1979
WALKER 256 Ka.	Glaselektrode		7,03	Einzelmessung	SONG et al., 1980
DS-Carcinosarkom	Antimonelektrode	6,1 - 7,3	6,59	Azidose in vitalem, Alkalose in nekrotischem Gew.	MÜLLER-KLIESER et al., 1981
DS-Carcinosarkom	Antimonelektrode		6,6 7,4	vitales Gewebe nekrotisches Gewebe	BUSSE et al., 1981
Rhabdomyosark. Sarkom, Karzinome, Schwannom	Glaselektrode	6,91-7,45 7,01-7,16	7,15 7,07		van den BERG et al., 1982
TVIA Tumor	Glaselektrode	6,8 - 7,1 6,7 - 7,1	7,0 6,9	Tumorgewicht: 1,0-2,5 g Tumorgewicht: 4,0-6,0 g	JÄHDE et al., 1982
Yoshida-Sarkom MC-7 Sarkom D-23 Karzinom	Glaselektrode		7,19 7,17 7,13		DICKSON und CALDERWOOD, 1983
WALKER 256 Ka.	Sammeln interstitieller Flüssigkeit	6,1 - 7,5 6,0 - 6,3	6,98	Tumolvolumen < 10 cm ³ große, ulzerierte Tumoren	JAIN et al., 1984
WALKER 256 Ka.	Glaselektrode	7,1 - 7,5		Implantation der pH-Elektrode	HINSULL et al., 1984
A15A5 Gliom	³¹ P-NMR	6,9 - 7,7	7,16	vermehrte Azidose in nekrotischen Gewebesebenen	KOEZE et al., 1984
Yoshida-Sarkom Mammarkarzinome	Glaselektrode	6,41-7,71 6,62-7,38	6,87 6,94		vorliegende Arbeit

Tabelle 13: Gewebe-pH-Werte in malignen Tumoren des Menschen

Tumoren	Methode	pH-Bereich	pH-Mittelwert	Bemerkungen	Literatur
Karzinome Sarkom	Glaselektrode	6,72-6,85	6,78 6,86	Messung am exzidierten Gewebe	MILLET, 1920
Mammakarzinom	Chinhydron-elektrode	6,00-7,56	6,60	Messung am exzidierten Gewebe	OKUNEFF, 1933
Karzinome -nekrotisch Fibrosarkom	Glaselektrode	5,61-6,75 7,27-7,98 6,17-6,39	6,33 7,48 6,25	Messung am exzidierten Gewebe	MEYER et al., 1948
Karzinome d. weibl. Genitale	Glaselektrode	6,4 - 7,2	6,94	syst. Hyperglykämie	NAESLUND und SWENSON, 1953
Neubildungen der Haut	Glaselektrode	5,4 - 7,7		pH-Werte > 7,0 in Nekrosen	INCH, 1954
Hirntumoren	Glaselektrode	6,45-7,25	6,91	Nekrosen: pH < 7,0; Zyste : pH > 7,0	PAMPUS, 1963
Melanome Mammakarzinom	Glaselektrode	6,63-6,90	6,80 7,00		ASHBY, 1966
Mammakarzinome	Glaselektrode	6,85-7,65	7,29	Tumor saurer als Normalgewebe	van den BERG et al., 1982
Primärtumoren und Metastasen	Glaselektrode	5,6 - 7,2		pH-Abnahme mit Anstieg des Tumorgewichts	THISTLETHWAITE et al., 1984
Mammakarzinome	Glaselektrode	6,71-7,60	7,22	Tumor saurer als Normalgewebe	WIKE-HOOLEY et al., 1984
Primärtumoren und Metastasen	Glaselektrode	6,5 - 7,7	7,25	Tumor saurer als Normalgewebe	WIKE-HOOLEY et al., 1985
Gliome - lang- sam wachsend - schnell wachsend	³¹ P-NMR Glaselektrode ³¹ P-NMR Glaselektrode	6,95-7,20 6,85-7,34 6,8 - 6,9 6,6 - 7,4		Nekrose alkalischer als Normalgewebe	SILVER, 1985
medulläres Mammakarzinom	Glaselektrode	5,78-7,52	6,81	xenotransplantierte Tumoren	vorliegende Arbeit
Plattenepithel- karzinom d. Mamma	Glaselektrode	6,51-7,62	7,04	xenotransplantierte Tumoren	vorliegende Arbeit

(Dave et al., 1985). Die Durchblutungseinschränkung führt auch hier zu einer inadäquaten konvektiven Ver- und Entsorgung des Gewebes.

Eine Folge der mangelhaften und inhomogen verteilten O_2 -Versorgung ist die Manifestation von Hypoxie- und Anoxiebezirken. So liegen nach eigenen Untersuchungen 35% der in xenotransplantierten menschlichen Mammakarzinomen gemessenen pO_2 -Werte zwischen 0 und 1 mmHg (KALLINOWSKI und VAUPEL, 1986). Die Einschränkung der nutritiven Durchblutung führt aber nicht nur zu einem verschlechterten O_2 -Antransport, sondern auch zu einem verminderten CO_2 -Abtransport, und damit zu einer Erhöhung des CO_2 -Partialdruckes im Gewebe (GULLINO et al., 1965; VAUPEL, 1974), die außer einer Ansäuerung des Tumorgewebes eine Veränderung der Stoffwechselfunktionen von Tumorzellen bewirkt (KIELER, 1960; NISSEN, 1960; VAUPEL et al., 1971).

Die Diffusionsreichweite ist für Glukose größer als für Sauerstoff (KALLINOWSKI und VAUPEL, 1986). Daher steht hypoxischen Tumorzellen sehr wahrscheinlich noch Glukose als Substrat zur Verfügung (VAUPEL und THEWS, 1976; KALLINOWSKI und VAUPEL, 1986). Wie der β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotient im tumorvenösen Blut zeigt, wird durch die zunehmende Tumorphypoxie aber die intramitochondriale Energieproduktion vermindert (KALLINOWSKI et al., 1985b). O_2 -mangelversorgte, aber noch vitale Tumorzellen werden infolgedessen die zur Verfügung stehende Glukose nicht mehr oxidieren, sondern nur noch zu Milchsäure umsetzen. Die beschriebene Entsorgungsstörung des Tumorgewebes führt zu einer Anhäufung von Milchsäure und damit zu der bekannten Tumorzidose.

Nach Befunden an Zellkulturen und Nagetiertumoren soll ein Großteil der im Tumor entstehenden Milchsäure aus der Aminosäure Glutamin stammen (zusammenfassende Darstellung s. EIGENBRODT et al., 1985). Der Stoffwechselweg des Gluta-

min zu Laktat ist in Abb.31 schematisch dargestellt. Es ist ersichtlich, daß bereits bei den ersten Schritten der Glutaminolyse, d.i. die Umsetzung von Glutamat zu α -Ketoglutarat, NADH gebildet und in den folgenden Stoffwechselschritten nicht mehr zurückgewonnen wird. Da für die mitochondriale Umsetzung dieses Nukleotids jedoch Sauerstoff benötigt wird, ist zur Energiegewinnung bei mangelhafter Sauerstoffversorgung zwar noch eine Glykolyse, aber keine Glutaminolyse mehr möglich. Konsequenterweise konnte ein Glutaminverbrauch bisher nur bei guter Sauerstoffversorgung der Tumorzellen nachgewiesen werden: in Zellkulturen mit Sauerstoffpartialdrücken von 100 mmHg und höher und in Nagetiertumoren, bei denen das Trägartier reinen Sauerstoff atmete mit entsprechender Erhöhung der Sauerstoffpartialdrücke im Tumor (SAUER et al., 1982). Bei den untersuchten xenotransplantierten Mammakarzinomen konnte bei normalem Atemgasstatus der Tiere im Mittel keine Nettoglutaminaufnahme nachgewiesen werden (KALLINOWSKI et al., 1984a, 1985a). Da zudem bei einer Erhöhung des Glukoseangebotes eine vermehrte Bildung von Milchsäure, gefolgt von einer Absenkung des mittleren pH-Wertes beobachtet wird (RAUEN et al., 1968), ist anzunehmen, daß Milchsäure von dem Tumorgewebe in situ vor allem aus Glukose gebildet wird.

Die beobachtete Tumorazidose wird somit durch eine hohe aerobe und anaerobe Glykolyserate und durch eine, für die Erfordernisse des Tumorgewebes unzureichende Durchblutung verursacht. Die mangelhafte Durchblutung führt zu einer Akkumulation der entstehenden Milchsäure und von anderen sauren Stoffwechselendprodukten, z.B. von Ketonkörpern, und zu einer Erhöhung des Kohlendioxidpartialdruckes (VAUPEL, 1974).

Die schlechtere Gefäßversorgung des Tumorzentrums im Vergleich zur Tumoreripherie (SCHEID, 1961) bewirkt dabei die bei den Yoshida-Sarkomen im Mittel beobachtete Verschie-

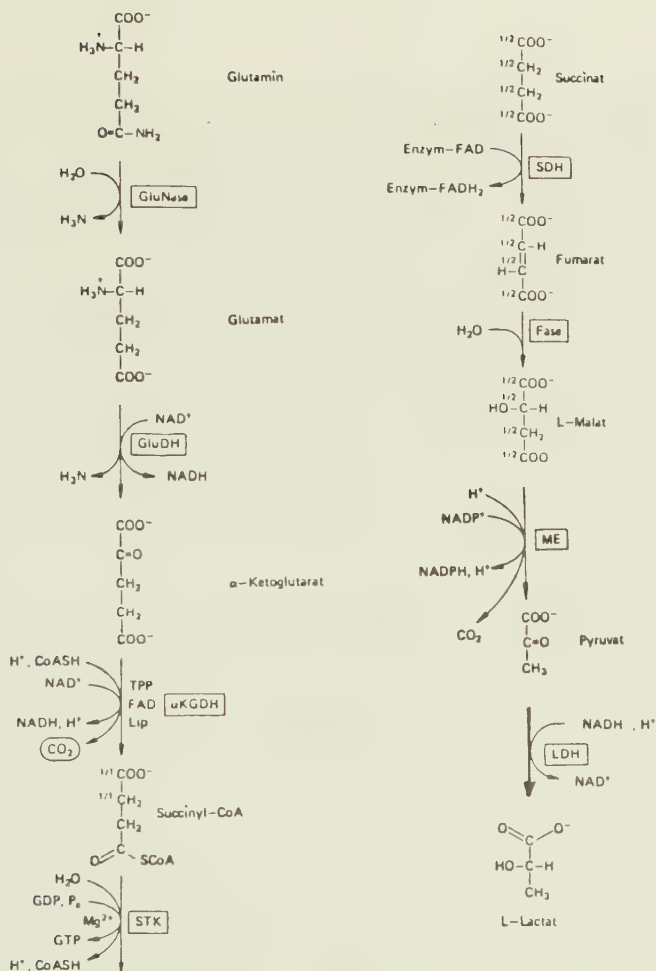


Abb.31: Stoffwechselweg des Glutamin zu Laktat mit beteiligten Enzymen. GluNase = Glutaminase; GluDH = Glutamatdehydrogenase; α KGDH = α -Ketoglutarat-Dehydrogenase; STK = Succinat-Thiokinase; SDH = Succinat-Dehydrogenase; Fase = Fumarase; ME = Malic Enzyme; LDH = Laktatdehydrogenase (nach JUNGERMANN und MÖHLER, 1980)

bung der pH-Verteilung vom Tumorrand zum Tumorzentrum (vgl. Abb. 13) zu niedrigeren pH-Werten. Ein solcher Gradient tritt bereits in rein diffusionslimitierten Modellen auf (ACKER et al., 1984) und wird auch in anderen Nagetiertumoren beobachtet (JÄHDE und RAJEWSKY, 1982; JÄHDE et al., 1982; DICKSON und CALDERWOOD, 1983; KOEZE et al., 1984; RHEE et al., 1984). Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit (s. Abb. 14) werden an individuellen Tumoren von einigen Autoren aber auch andere Verläufe gefunden: keine Änderung des pH-Wertes mit zunehmender Eindringtiefe (JÄHDE et al., 1982; KOEZE et al., 1984), ein pH-Abfall, gefolgt von einem pH-Anstieg mit zunehmender Eindringtiefe (RHEE et al., 1984) oder ein kontinuierlicher pH-Anstieg (KOEZE et al., 1984; RHEE et al., 1984).

Die mit steigendem Tumorgewicht fortschreitende Verschlechterung der Tumordurchblutung ist in der vorliegenden Untersuchung im Mittel nicht von einem stetigen Absinken der gemessenen Tumor-Gewebe-pH-Werte begleitet, sondern es kann bei den Xenotransplantaten als Trend sogar ein Anstieg der Tumor-pH-Werte auftreten (vgl. Abb. 8, 10, 12). Dieser Befund stimmt überein mit Befunden von VAUPEL et al. (1981). Andere Autoren hingegen berichten über eine monotone Verschiebung der pH-Verteilung zu niedrigeren Werten mit höheren Tumorgewichten (KAHLER und MOORE, 1962; NAVON et al., 1978; JÄHDE et al., 1982; EVANOCHKO et al., 1983; JAIN et al., 1984; THISTLETHWAITE, 1984, IRVING et al., 1985; RHEE et al., 1985). Bei einer kontinuierlichen Messung hingegen gelingt es, im Wachstumsverlauf des Tumors eine pH-Abnahme nachzuweisen, die von einem pH-Anstieg gefolgt ist (HINSULL et al., 1984). In der vorliegenden Untersuchung wurde ein ähnliches Verhalten als Trend bei den Xenotransplantaten menschlicher Mammakarzinome gefunden (s. Abb. 10, 12).

Diese auf den ersten Blick widersprüchlichen Befunde sind damit zu erklären, daß die schweren Störungen der

Tumormikrozirkulation nicht nur zu einer Verschlechterung des Sauerstoff-, sondern auch des Glukoseangebotes und nachfolgend der Glukoseaufnahme führen, wie es für xenotransplantierte Mammakarzinome nachgewiesen wurde (VAUPEL et al., 1985a). Da die Milchsäureproduktion in diesen Tumoren von der Glukoseaufnahme abhängt (KALLINOWSKI et al., 1985b), kann geschlossen werden, daß die Abnahme der Tumordurchblutung über eine Einschränkung der Verfügbarkeit des Substrates für die Glykolyse auch zu einer Abnahme der Milchsäureproduktion führen kann. In der Tat wird bei xenotransplantierten menschlichen Mammakarzinomen mit fortschreitendem Tumorgewicht zunächst eine Zunahme der gewichtsbezogenen Laktatproduktion bei kleineren Tumoren gefunden, die von einer Abnahme der Laktatproduktion bei größeren Tumoren gefolgt ist (DAVE et al., unveröffentlichte Ergebnisse; s. Abb. 32). Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Befunden anderer Arbeitsgruppen überein (SCHMIDT, 1962; RAUEN et al., 1969). Ein ähnliches Muster wurde für die medianen pH-Werte in xenotransplantierten menschlichen Mammakarzinomen unterschiedlichen Feuchtgewichtes gefunden. Dieses Verhalten der pH-Werte könnte somit durch Veränderungen der Milchsäureproduktion bedingt sein.

Zudem treten in den untersuchten Tumoren mit zunehmendem Gewicht regressive Veränderungen und Nekroseareale auf. In der entstehenden Nekrosezone sistieren zum einen die Glykolyse und die CO_2 -Produktion, zum anderen werden durch die Proteindenaturierung protonenakzeptierende Strukturen (SH-Gruppen u.a.) frei (SÖRENSEN und JÜRGENSEN, 1911; SANDRITTER und BENEKE, 1974; ROTTER, 1976; EDER und GEDIGK, 1977). Dies vermindert die Azidität des Gewebes (VAUPEL, 1982b). Tumoren mit ausgeprägten Nekrosearealen zeigen infolgedessen gegenüber vornehmlich vitalem Tumorgewebe eine Verschiebung der pH-Verteilung zu weniger sauren pH-Werten. Jedoch liegt der mittlere pH-Wert auch in Tumoren mit etablierter Nekrose noch deutlich niedriger als der des arteriellen Blutes.



Abb. 32: Laktatabgabe ($\dot{V}_{La}$) von 65 Xenotransplantaten von 9 verschiedenen menschlichen Mammarkarzinomen unterschiedlichen Tumorfeuchtgewichtes (nach DAVE et al., unveröffentlichte Befunde). Die gestrichelte Kurve soll den Trend verdeutlichen.

Besonders deutlich wird dieses Verhalten an dem untersuchten Plattenepithelkarzinom der menschlichen Brustdrüse (vgl. Abb. 6). Dieser Tumor zeigt bereits in frühen Wachstumsstadien regressive Veränderungen und Nekrosen. Mit zunehmendem Tumoralter wird der Anteil nekrotischen Materials am Tumorgesamtgewicht deutlich größer. Bereits kleine Plattenepithelkarzinome zeigen daher einen im Mittel höheren pH-Wert als vorwiegend vitale medulläre Mammakarzinome. Mit zunehmendem Tumorgewicht verschiebt sich die pH-Verteilung weiter zu höheren pH-Werten. Eine "Alkalose" in nekrotischem Tumormaterial wurde auch von anderen Autoren gefunden (vgl. Tabelle 11-13).

Das untersuchte Plattenepithelkarzinom der menschlichen Mamma zeigt jedoch noch andere, in diesem Zusammenhang wesentliche Besonderheiten. Untersucht man dieselbe Zelllinie als gewebsisolierten Tumor, wird eine 7-fache Erhöhung der Ammoniakkonzentration im tumorvenösen Blut gegenüber der des arteriellen Blutes gefunden. In Gewebebezirken um nutritive Gefäße müssen demnach hohe Konzentrationsgradienten von Ammoniak auftreten. Diese hohen Ammoniakkonzentrationen könnten für die frühe Nekroseentstehung in dem untersuchten Plattenepithelkarzinom verantwortlich sein. Jedoch muß auch in Betracht gezogen werden, daß hohe Ammoniakkonzentrationen im Gewebe per se eine Alkalisierung des Gewebes verursachen können.

Die gefundene hohe Ammoniakabgabe bei den Plattenepithelkarzinomen könnte durch eine unzureichende Ankoppelung von Ammoniak an Glutaminsäure zustande kommen. Für diese Hypothese sprechen die Befunde, daß einerseits die Glutaminsäurekonzentration im tumorvenösen Blut von Xenotransplantaten des Plattenepithelkarzinoms dreimal höher ist als diejenige des arteriellen Blutes und daß andererseits eine Glutaminausscheidung in dem untersuchten Plattenepithelkarzinom fehlt (KALLINOWSKI et al., 1984a, 1985c).

Die im individuellen Tumor zu messende pH-Verteilung ergibt sich demnach als eine Resultante aus der inhärenten Glykolyserate, der Verfügbarkeit von Substraten, dem Energieumsatz, dem Abtransport von Protonen mit dem venösen Blut, der Pufferungskapazität des Gewebes und dem Nekroseanteil im Tumor. Weiterhin können metabolische Besonderheiten der Tumorzellen die pH-Verteilung im Tumor in hohem Maße beeinflussen.

Ein wesentlicher Angriffspunkt für die vielfältigen biologischen Wirkungen einer veränderten Wasserstoffionenkonzentration (s. Tabelle 1) liegt intrazellulär. Daher sind Veränderungen des pH-Wertes im intrazellulären Raum neben denjenigen des extrazellulären Raumes von besonderem Interesse. Einige der bislang vorliegenden Ergebnisse bzw. eigene Untersuchungen (KALLINOWSKI und VALET, unveröffentlichte Ergebnisse) weisen darauf hin, daß die freie Wasserstoffionenkonzentration in der Zelle wahrscheinlich reguliert und kontrolliert, also aktiv verändert werden kann. Die pH-Kontrolle bedeutet allerdings keine pH-Konstanz, sondern der extra- und intrazelluläre pH-Wert sind komplex miteinander verknüpft. Die Regulationsmechanismen beruhen auf Pufferung, den Anpassungen des Zellmetabolismus, Wasserstoffionentransport über die Zellmembran aus der Zelle oder in subzelluläre Kompartimente und Veränderungen des Säure-Basen-Status des Gesamtorganismus als Reaktion auf Änderungen der Zusammensetzung des Blutes und des Blut-pH-Wertes (zusammenfassende Darstellungen s. ROBSON et al., 1968; WADDELL und BATES, 1969; GILLIES und DEAMER, 1979; ROOS und BORON, 1981; NUCCITELLI und DEAMER, 1982). Für die Regulation des intrazellulären pH-Wertes scheint dabei der gegenläufige Transport von Na^+ - und H^+ -Ionen, der sog. Na^+/H^+ -Antiport von besonderer Wichtigkeit zu sein (zusammenfassende Darstellung s. KRULWICH, 1983). Dieser Antiport ist wahrscheinlich auch in Tumorzellen vorhanden und wirkt neben der Regulation des intrazellulären pH-Wertes an der Regulation der Zellgröße und an Zellteilungs- und an Zelldifferenzierungsvorgängen

mit (LEVINSON et al., 1980; MOOLENAAR et al., 1981; SCHULDNER und ROZENGURT, 1982; ROTHENBERG et al., 1983).

Die Fähigkeiten der Tumorzelle zur Kontrolle des intrazellulären pH-Wertes hängen dabei in großem Ausmaß von den Bedingungen ab, unter denen die Zelle lebt (NAVON et al., 1977). So konnte einerseits gefunden werden, daß der intrazelluläre pH-Wert Veränderungen des extrazellulären pH-Wertes direkt folgt (POOLE et al., 1964; SCHLOERB et al., 1965; POOLE, 1967; ALBERS et al., 1981). Andererseits sprechen viele Befunde dafür, daß der intrazelluläre pH-Wert auch weitgehend konstant bleiben kann, während der extrazelluläre pH-Wert in weiten Grenzen variiert wird (THOMAS et al., 1979; HEINZ et al., 1981; GILLIES et al., 1982; GONZALEZ-MENDEZ et al., 1982; BOWEN und LEVINSON, 1984). Nach eigenen Befunden (KALLINOWSKI und VALET, unveröffentlichte Ergebnisse) sind sowohl Tumorzellen (DS-Carcinosarkom) als auch Entzündungszellen, die sich beide in Aszitesflüssigkeit befinden, in der Lage, einen H^+ -Konzentrationsgradienten über die Zellmembran von 2,5 pH-Einheiten länger als 60 Minuten bei nahezu konstantem intrazellulärem pH-Wert zu tolerieren. Verbringt man die Zellen jedoch aus der Aszitesflüssigkeit in eine "artifizielle" Pufferlösung, sinkt der mittlere intrazelluläre pH-Wert der Zellen bei ähnlichem H^+ -Konzentrationsgradienten über die Zellmembran innerhalb von 20 Minuten um 0,7 pH-Einheiten.

Werden demnach die vorhandenen Regulationsmechanismen überfordert, so bricht der pH-Gradient über die Zellmembran zusammen. Als Konsequenz sistiert die zelluläre Energieproduktion. Bleibt dieser Zustand längere Zeit bestehen, kann der Tod der Zelle die Folge sein. Es wird diskutiert, daß der niedrige intrazelluläre pH-Wert zu einer Absenkung des intralysosomalen pH-Wertes führt (OHKUMA und POOLE, 1978), somit die lysosomale Membran labilisiert (zusammenfassende Darstellung s. REIJNGOUD und TANGER, 1977) bzw. lysosomale

Enzyme freisetzt und so zur Autodigestion der Zelle führt. Für diese Auffassung spricht, daß in Phasen der Tumorregression die Aktivität lysosomaler Enzyme im Tumor erhöht ist (KAMPSCHMIDT und WELLS, 1968; SHAMBERGER, 1969; GULLINO et al., 1972). Gegen diese Auffassung spricht aber, daß die morphologischen Veränderungen des Zelltodes diffus im Zytoplasma und nicht in der Nähe von Lysosomen beginnen (DAVIDOFF, 1981). Auch das Auftreten verschiedener Nekroseformen (Koagulations- und Kolliquationsnekrose) spricht gegen einen einfachen, einheitlichen Mechanismus des Zelltodes.

Jedoch bietet das Phänomen, daß der Tod der Zelle auf eine Absenkung des intrazellulären pH-Wertes folgen kann, möglicherweise einen therapeutischen Ansatz, auch ohne die Mechanismen genau zu kennen, die zu dem Zelltod führen. Da ein Großteil der Zellen in vielen soliden Tumoren unter ungünstigen Stoffwechselbedingungen einem großen pH-Gradienten ausgesetzt ist, könnte eine Versteilerung dieses Gradienten und damit die Überforderung der zellulären Regulationsmechanismen zum Tode der Tumorzellen und damit zur Regression der Tumoren führen.

In der Tat konnte eine Tumorregression im Tierversuch nach der Induktion einer systemischen Azidose beobachtet werden (ANGHILIERI, 1975; HARGUINDEY et al., 1979). Eine davon abweichende Möglichkeit bietet der Ansatz, den H^+ -Ionen-Transport über die Zellmembran direkt zu hemmen, z.B. durch Gabe von Amilorid, einem Blocker des Na^+/H^+ -Antiports. Nach ersten Befunden ist die Gabe von Amilorid in einer Konzentration von 5×10^{-4} Mol/l in der Lage, den intrazellulären pH-Wert um 0,3 - 0,4 pH-Einheiten abzusenken (KALLINOWSKI und VALET, unveröffentlichte Befunde). Weiterhin gelang es in vorläufigen Experimenten, an Einzelzellkulturen konzentrationsabhängig mit Amilorid das Wachstum von Tumorzellen zu hemmen (KALLINOWSKI et al., unveröffentlichte Befunde, s. Abb. 33). In einem Therapieversuch an Nagetier-



Abb. 33: Einfluß verschiedener Amilorid-Konzentrationen (C_{Amilorid}) auf das Proliferationsverhalten von Zellen eines Mammasarkoms der Maus (EMT6/Ro) nach 7-tägigem Wachstum in BME (Basal Medium Eagle, angereichert mit 15% Serum von neugeborenen Kälbern und 1% Glutamin). Eingesetzt wurden 5×10^4 Zellen pro Petrischale in 15 ml Kulturmedium.

tumoren ist in der vom Trägartier tolerierten Dosis allerdings bislang keine überzeugende therapeutische Wirkung nachzuweisen (KALLINOWSKI et al., unveröffentlichte Befunde). Trotzdem ist in der Zukunft sicherlich eine genauere Kenntnis der Regulation der intrazellulären Wasserstoffionenkonzentration im Hinblick auf die Tumorthherapie unabdingbar.

4.2.3. Änderungen der pH-Verteilungen in Normal- und Tumorgewebe unter lokalisierter Ultraschallhyperthermie (44°C, 60 min)

Während einer lokalisierten Ultraschallüberwärmung auf 44°C für 60 Minuten wird in der Regel die in malignen Tumoren bereits bei Normothermie bestehende Azidose verstärkt, während sich die pH-Werte in der mit der gleichen Wärmedosis überwärmten Subkutis nicht ändern (vgl. Tabelle 3, 4, 5).

Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen von v. ARDENNE und REITNAUER (1978 u. 1979), SONG et al., (1980a, 1982), VAUPEL (1982b), NG et al., (1982), DICKSON und CALDERWOOD (1983), EVANOCHKO et al., (1983) und RHEE et al. (1984) (zusammenfassende Darstellung s. Tabelle 14). Zur Auslösung dieser hyperthermiebedingten Veränderungen des Gewebe-pH-Wertes scheint allerdings das Überschreiten einer "kritischen" Gewebetemperatur von 42°C notwendig zu sein (VAUPEL et al., 1982). Eine solche "Schwelle" scheint auch für therapeutische Wirkungen zu existieren (DEWHIRST et al., 1984b).

Die Annahme einer "kritischen" Temperatur von 42°C wird durch Untersuchungen von DICKSON und CALDERWOOD bestätigt (1979), die bei Yoshida-Sarkomen keine Absenkung des mittleren pH-Wertes bei einer Hyperthermiebehandlung mit 42°C für 60 Minuten fanden. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, daß in Yoshida-Sarkomen bei lokalisierter

Tumor	Charakterisierung	Spezies	Körpergewicht (g)	Überwärmungsmethode	Ausgangstemperatur (°C)	Hyperthermiedauer (min)	pH-Abfall (pH-Einheiten)	Bemerkungen	Autoren	
DS-Karzinomsarkom	12 g	Wistar-Ratte	240	Infrarotquelle	35,5	42 - 43	150	0,42 ± 0,14	HG	V. ARDENNE und REITNAUER, 1978
DS-Karzinomsarkom	7 - 12 g	Wistar-Ratte	200 - 250	Infrarotquelle	?	42 - 43	130 - 195	0,47 ± 0,19	HG	V. ARDENNE und REITNAUER, 1979
Yoshida-Sarkom	1,0 - 1,5 cm ³	Wistar-Ratte	200 - 250	Immersion in 0,9 %iger NaCl	31 - 32	42	60	Ø	NG/HG	DICKSON und CALLENDER, 1979
WALKER 256-Karzinom	schnellwachsend versch. Größen	Sprague-Dawley-Ratte	200 - 300	Wasser-Immersion	33	43	60	0,10 - 0,30	NG	SONG et al., 1980
Mamma-Adenokarzinom	7 - 9 mm	A/J-Maus	?	Wasser-Immersion	ca. 30	43,5	30	0,25 - 0,40	NG	SONG et al., 1980
Mamma-Adenokarzinom	Durchmesser 8 - 10 Tg. alt	A/J-Maus	?	Wasser-Immersion	ca. 30	43,5	30	0,2	NG, keine Anasthesie, Immobilisiert	SONG et al., 1982
Mamma-Adenokarzinom	0,3 - 0,5 g	C3H-Maus	?	Mikrowellen (2,45 GHz)	30 - 34	43	60	0,54 ± 0,19	NG, keine Nekrose	VAJPEY, 1982
Mamma-Adenokarzinom (SCK-Tumor)	1,1 - 1,5 g	A/J-Maus	?	Wasser-Immersion	?	43,5	30	Ø	NG, viel Nekrose	
DINN Osteosarkom	1,0 - 2,0 g	C3H/HeJ-Maus	?	Hochfrequenz	?	47	15	0,25	NG	NG et al., 1982
MC - 7 Sarkom	1,0 - 1,5 g	Wistar-Ratte	200	Wasser-Immersion	31	42	180	0,20 - 0,40	NG, vitales Gewebe	DICKSON und CALLENDER, 1983
16/C Mamma-Adenokarzinom	1,3 g	C3H/He-Maus	?	Hochfrequenz (1,5 MHz)	?	47	15	0,1	NG	EVANGELIO et al., 1983
Mamma-Adenokarzinom (SCK - Tumor)	7 mm Durchmesser, 9 - 10 Tg. alt	A/J-Maus	?	Wasser-Immersion	33 - 34	43	30	0,2	NG, keine Anasthesie, Immobilisiert	RIZZI et al., 1984
versch. Tumoren	?	Mensch	?	?	?	42	60	pH-Anstieg: 0,25 - 0,55; NG	THIESTRAATJE et al., 1984	
Yoshida-Sarkom	um 1,4 g ⁰	Sprague-Dawley-Ratte	180 - 530	Ultraschall (1,7 MHz)	34	44	60	0,01	NG	vorliegende Arbeit
	um 2,4 g ⁰					44	60	0,26	NG	
	um 4,0 g ⁰					44	60	0,11	NG	
	um 2,2 g					44	60	0,40	NG	
Plattenepithelkarzinom der Mamma ²	um 3,6 g ⁰	rm/rm-Ratte	120 - 450 g	Ultraschall (1,7 MHz)	34	44	60	0,20	NG	vorliegende Arbeit
Med. Mamma-Ga ²	um 2,9 g ⁰ um 6,8 g	rm/rm-Ratte	120 - 450 g	Ultraschall (1,7 MHz)	34	44	60	0,10	NG	vorliegende Arbeit
						44	60	0,02	NG	

* = $\Delta T/\Delta t > 1,5$ °C/min; ⁰ = $\Delta T/\Delta t < 0,7$ °C/min; NG = physiologische Blutzuckerpiegel; HG = experimentell erhöhte Blutzuckerpiegel; ? = nicht angegeben; a = menschliches Karzinom, xenotransplantiert auf die (rm/rm)-Ratte

Überwärmung mit 44°C für 60 min eine deutliche pH-Absenkung auftritt. Auch bei menschlichen Tumoren kann bei Hyperthermietemperaturen unter 42°C kein pH-Abfall, sondern sogar ein pH-Anstieg beobachtet werden (THISTLETHWAITE et al., 1984; WIKE-HOOLEY et al. 1984). In der vorliegenden Untersuchung kann hingegen bei Xenotransplantaten menschlicher Tumoren eine pH-Absenkung nach einer Tumorhyperthermie von 44°C für 60 min gefunden werden.

Die Veränderung des Tumor-pH-Wertes bei der Hyperthermie hängt aber nicht nur von der Hyperthermietemperatur, sondern auch von der Hyperthermiedauer ab. So ist auch die langdauernde Anwendung von 42°C (über 3 Stunden) am MC 7 Sarkom von einer pH-Absenkung um 0,2 - 0,4 pH-Einheiten gefolgt (DICKSON und CALDERWOOD, 1983).

Der Zusammenhang zwischen Hyperthermietemperatur und -dauer einerseits und der dem Gewebe applizierten Wärmemenge bzw. der Reaktion des Gewebes auf die aufgenommene Wärmemenge andererseits wird häufig mit dem Begriff "Wärmedosis" beschrieben. Zwar ist der physikalische Begriff der Wärmedosis als die auf das Gewebe übertragene Wärmemenge klar definiert, jedoch sind bislang noch keine allgemein akzeptierten Meßgrößen beschrieben worden, mit deren Hilfe sich Wärmedosis-Wirkungskurven in einfachen, klinisch praktikablen Verfahren bestimmen lassen.

Folgende pathophysiologische Mechanismen müssen als Gründe für die verstärkte Gewebezidose in malignen Tumoren während lokaler Hyperthermie in Betracht gezogen werden: Zunächst führen Temperaturänderungen zu Verschiebungen in den Verteilungsgleichgewichten extra- und intrazellulärer Puffersysteme, die von einer geänderten Verteilung der H^+ -Ionen und einer Änderung des DONNAN-Gleichgewichtes gefolgt sind (VAUPEL et al., 1981; VAUPEL, 1982). Gewöhnlich erfolgt eine Verschiebung zu niedrigeren pH-Werten, wenn die Tempe-

ratur erhöht wird. Dieser Effekt ist nicht tumorspezifisch, sondern tritt auch in allen anderen untersuchten Körpergeweben (einschließlich Blut und Plasma) während einer Überwärmung auf (STADIE und MARTIN, 1924; ROSENTHAL, 1948; ADAMSONS et al, 1964; RAHN et al., 1974; REEVES, 1976; HARRISON und WALKER, 1979). Weiterhin ist eine gesteigerte Stoffwechselaktivität des Tumors unter Hyperthermie zu beobachten. Für die Erhöhung des Tumorstoffwechsels bei Hyperthermie sind zwei Mechanismen verantwortlich, nämlich eine direkte Temperatureinwirkung auf den Stoffwechsel (van't Hoff-sche Regel) und eine indirekte Steigerung des Metabolismus aufgrund des verbesserten Substratangebotes infolge einer Zunahme der nutritiven Durchblutung bei gemäßigter Hyperthermie und in der Anfangsphase der Hyperthermiebehandlung mit höheren Temperaturen (BICHER et al., 1980; VAUPEL et al., 1982b). Das erhöhte Angebot an Glukose führt zu einer exzessiven Milchsäurebildung (RYU et al., 1982; LEE et al., 1985), da der glykolytische Abbau der Glukose in Tumorzellen offensichtlich nicht durch eine Überwärmung beeinträchtigt wird. Jedoch ist die Einschleusung von Pyruvat oder von Acetyl-CoA in den Citratzyklus unter diesen Bedingungen vermindert (STREFFER, 1985). Diese wärmebedingten metabolischen Veränderungen führen weiterhin zu einer Produktion von β -Hydroxybutyrat und Acetoacetat (STREFFER, 1985).

Zu dem erhöhten Glukoseangebot während der ersten Minuten einer Überwärmung mit höheren Temperaturen trägt darüberhinaus der vorübergehende Anstieg des Blutglukosespiegels unter der Wärmebehandlung bei (BEER-GABEL und YERUSHALMI 1981; VAUPEL et al., 1982a). Eine vorübergehende Erhöhung der Blutglukosekonzentration wurde auch in der vorliegenden Untersuchung nach lokaler Ultraschallüberwärmung von Yoshida-Sarkomen ohne eine gleichzeitige Erhöhung der Rektaltemperatur gefunden. Vermutlich ist diese Erhöhung durch eine verstärkte Sekretion von Glukokortikoiden und Katecholaminen und durch eine verminderte Sekretion von Insulin als Stress-

reaktion des Organismus auf einen lokalen Reiz durch die Ultraschallüberwärmung des Fußes zurückzuführen (BURMEISTER et al., 1982).

Weiterhin führt die Hyperthermiebehandlung zu einer Erhöhung des CO_2 -Partialdruckes im Tumorgewebe, was aus einer Zunahme der arterio-tumorvenösen CO_2 -Partialdruckdifferenz geschlossen werden kann (VAUPEL et al., 1980; VAUPEL, 1982b).

Die vermehrte H^+ -Ionenproduktion kann aber nur bei einem verminderten Abtransport der entstehenden Wasserstoffionen von einer Ansäuerung des Tumorgewebes gefolgt sein. Daher ist als wesentlichste Ursache für die Verstärkung der prävalenten Tumorazidose durch die Überwärmung der Zusammenbruch der Mikrozirkulation in malignen Tumoren unter diesen Bedingungen anzunehmen. Die Abnahme der Tumordurchblutung bei höheren Wärmedosen wurde von einer Vielzahl von Untersuchern beschrieben (ENDRICH et al., 1979; BICHER und VAUPEL, 1980; VAUPEL et al., 1980; SONG et al., 1980b; VAUPEL et al., 1982a, b, c; van den BERG-BLOK und REINHOLD, 1984; ENDRICH, 1984; MÜLLER-KLIESER und VAUPEL, 1984; VAUPEL et al., 1985c; zusammenfassende Darstellung s. EMAMI und SONG, 1984; REINHOLD et al., 1984; SONG, 1984, VAUPEL und KALLINOWSKI, 1985). Eine Verringerung der Tumordurchblutung unter lokaler Hyperthermie konnte auch für xenotransplantierte Tumoren gezeigt werden (KALLINOWSKI et al., 1984b). Zu dieser Reduktion der nutritiven Tumordurchblutung tragen eine Vielzahl von Mechanismen bei (zusammenfassende Darstellung s. VAUPEL und KALLINOWSKI, 1985):

1. die verminderte Verformbarkeit der roten Blutkörperchen mit nachfolgender Aggregatbildung (MURPHY, 1967; RAKOW und HOCHMUTH, 1975; WILLIAMSON et al., 1975; NASH und MEISELMAN, 1985; SCHMID-SCHÖNBEIN et al., 1984; BARNIKOL und BURKHARD, 1985).

2. das Auftreten von Erythrozytenextravasaten und Hämorrhagien in den Tumor
3. die Bildung von Thrombozytenaggregaten
4. die Anheftung von Leukozyten an die Gefäßwand
5. die nicht-enzymatische Bildung von Fibrinogenin-Gel und die nachfolgende intravaskuläre Thrombenbildung (COPLEY, 1980; COPLEY und KING, 1984)
6. die Erhöhung der Plasmaviskosität
7. die Zunahme der arterio-tumorvenösen Kurzschlußdurchblutung
8. die Ausbildung eines interstitiellen Ödems mit nachfolgender Abnahme der für die Perfusion wichtigen arterio-tumorvenösen Blutdruckdifferenz
9. die Vasodilatation der Gefäße in dem den Tumor umgebenden Wirtsgewebe, die zu einem "Steal-Phänomen" führt

Diesen Veränderungen der Tumorstrombahn entspricht die berichtete Morphologie von Tumoren nach lokaler Hyperthermie (von ARDENNE et al., 1979; EMAMI et al., 1981; OVERGAARD, 1976b, 1983).

Verschiedene Faktoren haben auf das Ausmaß der pH-Absenkung in malignen Tumoren unter lokaler Hyperthermie Einfluß. Die pH-Antwort auf identische Wärmedosen hängt in hohem Maße von der untersuchten Tumorzelllinie ab (vgl. Tabelle 5, 14). Insbesondere ist bemerkenswert, daß die unter der Wärmebehandlung bei den Xenotransplantaten menschlicher Mammakarzinome aufgetretenen pH-Absenkungen im Mittel nicht das Ausmaß erreichen, das bei gleicher Aufheizrate bei den Yoshida-Sarkomen gefunden wird. Es ist anzunehmen, daß die zwischen Yoshida-Sarkomen, xenotransplantierten medullären und Plattenepithelkarzinomen der menschlichen Brustdrüse beobachteten Unterschiede in der Veränderung des Gewebe-pH-Wertes auf die lokale Ultraschallüberwärmung in einem unterschiedlichen Verhalten der Mikrozirkulation der einzelnen Tumoren begründet sind. Diese Unterschiede werden zur Zeit intensiv untersucht (KLUGE et al., persönliche Mitteilung).

Das Tumorgewicht stellt einen weiteren wesentlichen Einfluß auf das Ausmaß der hyperthermiebedingten Übersäuerung dar. Einerseits sinkt der mittlere pH-Wert bei 1,5 g schweren Yoshida-Sarkomen im Gegensatz zu größeren Yoshida-Sarkomen selbst bei Applikation hoher Wärmedosen kaum (vgl. Abb. 15-18). Andererseits wird in kleinen medullären Xenotransplantaten eine stärkere Absenkung des mittleren pH-Wertes als in großen xenotransplantierten medullären Mammakarzinomen beobachtet (s. Abb. 25-27). Eine auf experimentellen Fakten basierende Erklärung für dieses Phänomen kann bislang nicht gegeben werden. Es ist in diesem Zusammenhang aber von Interesse, daß auch die Ansprech- und Heilungsrate von Tumoren in standardisierten Tiermodellen bei Überwärmungsbehandlungen von der Tumorgroße abhängt (DICKSON und ELLIS, 1976; LI und HAHN, 1984; URANO und KAHN, 1985). Weiter ist auffällig, daß sich unter Hyperthermie ein ausgeprägtes interstitielles Ödem bildet. Ein ähnliches Ödem wurde auch von REINHOLD und BERG-Blok (1985) sowie ZYWIETZ und KNÖCHEL (1985) beobachtet. Dieses interstitielle Ödem ist durch eine Permeabilitätssteigerung von Gefäßen zu erklären, wie sie im Zusammenhang mit der Hyperthermiebehandlung bekannt ist (LEFOR et al., 1985). Die Permeabilitätssteigerung führt zu einem Abstrom von Plasma aus den Blutgefäßen in das Interstitium. Da Lymphgefäße in einem Tumor fehlen (GULLINO, 1975), bildet sich als Folge ein interstitielles Ödem aus. Mit dem Abstrom von Eiweißen erhöht sich die Eiweißkonzentration und somit die Pufferkapazität im interstitiellen Raum. Dieser Mechanismus könnte bei den untersuchten Yoshida-Sarkomen, vor allem bei kleinen Tumoren, eine deutliche pH-Absenkung während der Hyperthermiebehandlung verhindern, da Yoshida-Sarkome mit niedrigen Tumorgewichten eine besonders ausgeprägte Ödembildung im Zusammenhang mit der Hyperthermiebehandlung aufweisen (s. Abb. 28). Gegen diese Auffassung spricht allerdings, daß die Größe des gebildeten Ödems nicht mit der während der Hyperthermie beobachteten pH-Verschiebung korreliert.

Als eine weitere wesentliche Einflußgröße auf die Effizienz der Hyperthermiebehandlung ist die Steilheit des Temperaturanstieges im Gewebe zu nennen (vgl. Abb. 19). Drei Mechanismen können für die Abhängigkeit der Tumorazidifizierung unter der Hyperthermie von der Aufheizrate verantwortlich sein. Bei Anwendung unterschiedlicher Aufheizraten, aber gleicher Hyperthermiedauer bei der gewünschten Hyperthermietemperatur müssen notwendigerweise unterschiedliche Wärmedosen appliziert werden. Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 34 verdeutlicht. Zur Vereinfachung ist bei der Betrachtung die Wärmedosis als das Produkt aus der Temperaturerhöhung (in Grad Celsius) und der Hyperthermiedauer (in Minuten) definiert.

$$\text{Wärmedosis } WD = \Delta T \times \Delta t \quad (1)$$

Mit Hilfe dieser Beziehung läßt sich abschätzen, daß die den Tumoren mit der kleinen Aufheizrate während der Aufheizung applizierte Wärmedosis etwa das Siebenfache der Wärmedosis beträgt, die den Tumoren mit der steilen Aufheizrate während der Aufheizphase gegeben wird. Da die Wärmedosen in beiden Gruppen nach dem Erreichen der Hyperthermietemperatur gleich sind, ist die ersteren Tumoren applizierte Wärmedosis insgesamt etwa 20% größer als die Wärmedosis, die Tumoren letzterer Gruppe appliziert wird.

Ein weiterer wichtiger Grund für die unterschiedlichen pH-Senkungen der beiden betrachteten Tumorgruppen könnte darin liegen, daß die bei niedrigen Temperaturen auftretende Flußsteigerung bei den Tumoren, die langsamer erwärmt wurden, erheblich länger anhält, als bei den Tumoren, die schnell erwärmt wurden. Diese initiale Druchblutungssteigerung würde zeitweise das Substratangebot an die Tumorzellen erhöhen. Das erhöhte Substratangebot könnte zu einer Steigerung des Metabolismus und damit zu einer Erhöhung der Konzentration saurer Metaboliten führen. Dieser Mechanismus

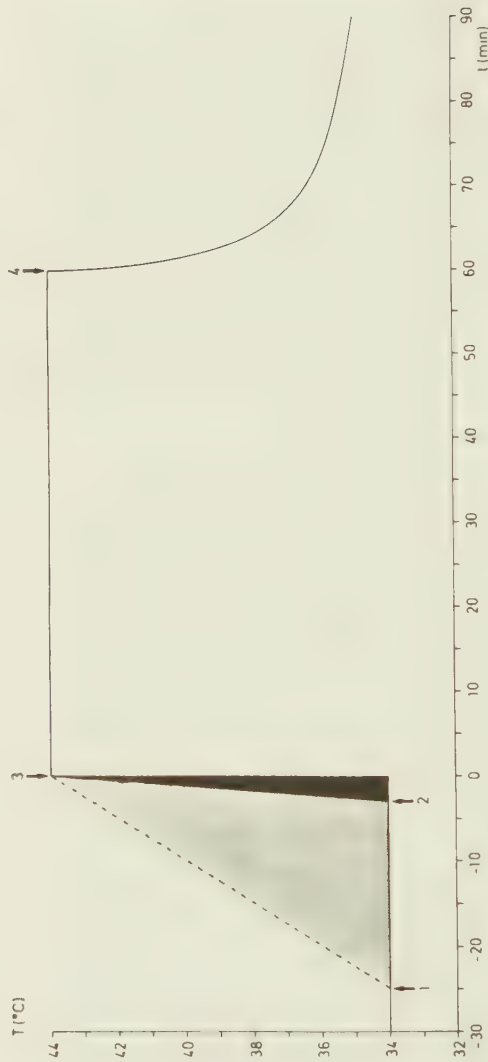


Abb. 34: Mittlere Temperaturänderungen während der Überwärmungsbehandlung in Tumoren, die mit Aufheizraten $\Delta T/\Delta t < 0,7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erwärmt wurden (gestrichelte Kurve) und in Tumoren, die mit Aufheizraten $\Delta T/\Delta t > 1,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erwärmt wurden (durchgezogene Kurve). 1 = Hyperthermiebeginn für Tumoren mit Aufheizraten kleiner $0,7^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 2 = Hyperthermiebeginn für Tumoren mit Aufheizraten größer $1,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 3 = Erreichen der Hyperthermiedauer von 60 Minuten in beiden Tumorgruppen; 4 = Hyperthermieende nach einer Hyperthermiedauer von 44°C in beiden Tumorgruppen. Die Wärmeflusskurve, die während der Aufheizphase appliziert wurde, ist für die Tumoren, die langsam erwärmt wurden, durch die Summe aus der schraffierten und der schwarzen Fläche und für die Tumoren, die schnell erwärmt wurden, durch die schwarze Fläche graphisch dargestellt.

würde nach dem hyperthermiebedingten Zusammenbruch der Mikrozirkulation eine Verstärkung der pH-Absenkung in den Tumoren mit der niedrigen Aufheizrate zur Folge haben.

Letztlich ist auch ein unterschiedliches biologisches Verhalten der Tumorgefäße und der Gefäße des Tumorbettes auf verschiedene Aufheizraten (DEWHIRST et al., 1984a, 1984c) zu berücksichtigen. Bei geringen Aufheizraten ist eine Stase in den, den Tumor umgebenden Gefäßen des Normalgewebes erst bei höheren Temperaturen und/oder längeren Hyperthermiezeiten zu beobachten als bei höheren Aufheizraten. Das hat zur Folge, daß die Blutversorgung des Tumorgewebes und damit auch der Substratantransport in den Tumoren der Gruppe mit der niedrigeren Aufheizrate für längere Zeit erfolgen kann als in den Tumoren der Gruppe mit der hohen Aufheizrate. Auch dieser Mechanismus kann zu einer verstärkten Azidifizierung des Tumorgewebes nach dem hyperthermieinduzierten Zusammenbruch der Tumordurchblutung führen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine Abhängigkeit der Dosis-Wirkungsbeziehung von der Dosis-Rate, die z.B. aus dem Bereich der Strahlentherapie bekannt ist, sich somit auch in der Hyperthermiebehandlung finden läßt.

Auch die Lokalisation im individuellen Tumor kann einen Einfluß auf das Ausmaß der pH-Absenkung in malignen Tumoren unter lokaler Hyperthermie haben. So wird in der Tumorschale der mittlere pH-Wert etwas stärker als in dem Tumorzentrum abgesenkt. Dies kann zwei Mechanismen zugeschrieben werden: erstens ist das Tumorzentrum bereits vor der Überwärmung schlechter mit Substraten versorgt als die Peripherie. Zweitens ist der pH-Wert im Tumorzentrum bereits vor der Hyperthermiebehandlung niedriger als in der Tumorperipherie. Da Glykolyseenzyme durch eine saure Umgebung gehemmt werden, ist folglich die pH-Absenkung im Tumorzentrum etwas geringer als in der Tumorperipherie.

Weiter ist zu bedenken, daß die unter Normothermiebedingungen inhomogene Temperaturverteilung in den Tumoren (JAIN, 1980; GULLINO et al., 1982; DAVE et al., 1984) unter der Wärmeeinwirkung zwar gleichmäßiger, aber nicht völlig homogen wird (BLENDSTRUP et al., 1984; für eine Übersicht s. VAUPEL und KALLINOWSKI, 1985). In Abhängigkeit von der lokalen Gefäßversorgung und von den Absorptionseigenschaften und der Wärmeleitfähigkeit benachbarter Gewebe können sich - leider nicht vorhersagbare - Temperaturgradienten mit Konsequenzen für die zu messende pH-Verteilung ergeben.

Die hyperthermiebedingte Tumorübersäuerung bleibt mindestens bis zu 12 Stunden nach der Hyperthermie erhalten (SONG et al., 1982). 24 Stunden nach der Überwärmung haben sich die durch die Hyperthermie eingetretenen Veränderungen der Tumor-pH-Verteilung zurückgebildet (s. Tabelle 4, 5; Abb. 15-23).

Als Folge der über mehrere Stunden anhaltenden, verstärkten Azidose des Tumorgewebes nach lokaler Überwärmung mit adäquaten Wärmedosen im Zusammenspiel mit der durch den Zusammenbruch der Mikrozirkulation bedingten Vergrößerung der Hypoxieareale im Tumor ist eine "Sensibilisierung" der Tumorzellen gegenüber einer weiteren Wärmebehandlung zu beobachten (OVERGAARD, 1976a; FREEMAN et al., 1977; HAVEMAN, 1979; GERWECK et al., 1980; OVERGAARD und NIELSON, 1980; GERWECK und RICHARDS, 1981; FREEMAN et al., 1985). In diesem Zusammenhang berichten HOFER und MIVECHI (1980), daß vor allem der intrazelluläre pH-Wert ausschlaggebend für die "Sensibilisierung" der Tumorzelle bei erniedrigten extrazellulären pH-Werten ist. Demgegenüber finden DICKSON und OSWALD (1976) keine Sensibilisierung der Tumorzelle gegenüber einer Hyperthermiebehandlung bei niedrigen intrazellulären pH-Werten. Darüberhinaus wird die Geschwindigkeit vermindert, mit der die Zellen eine Thermotoleranz, d.h. eine Resistenz gegenüber einer weiteren Wärmebehandlung entwik-

keln (NIELSON und OVERGAARD, 1979; DICKOMEY et al., 1981; zusammenfassende Darstellung s.OVERGAARD, 1985).

Über diese Mechanismen hinaus ist anzunehmen, daß alle beschriebenen Effekte (Zusammenbruch der Tumormikrozirkulation, vermehrte Ketogenese und Milchsäureproduktion, verstärkte Hypoxie und Azidose und eine verschlechterte Energiebereitstellung in der Tumorzelle zusammen mit direkten Hyperthermiewirkungen z.B. auf die Zellmembranen) den Zelltod und die Tumorregression nach Hyperthermie einleiten. Das gesamte komplexe Zusammenwirken der einzelnen Faktoren ist bislang allerdings nur unzureichend bekannt (zusammenfassende Darstellung s.HORNBACK, 1984; VAUPEL und KALLINOWSKI, 1985). Eine wesentliche Rolle scheint aber eine durch die Hyperthermie verschlechterte Energiebereitstellung zu spielen (KIM et al., 1980; HAVEMAN und HAHN, 1981; GERWECK et al., 1984). Die Abnahme energiereicher Phosphate nach der Hyperthermie kann in vivo direkt nachgewiesen werden (EVANOCHKO et al., 1983; LILLY et al., 1984). Die entscheidende Rolle der Mikrozirkulation bei diesen Veränderungen wird dadurch unterstrichen, daß solche Veränderungen in vitro bei therapeutisch wirksamen Temperaturen nicht nachgewiesen werden können (KNOP et al., 1985). Darüberhinaus könnte auch die sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesene vermehrte Aktivität lysosomaler Enzyme nach einer Überwärmungsbehandlung (TURANO et al., 1980; OVERGAARD und SKOVGAARD, 1977; BARRETT und WILLS, 1979) zum Tod der Tumorzelle führen. Eine solche Aktivierung lysosomaler Enzyme wird aber auch nach einer Strahlenbehandlung von Tumoren beobachtet (PARIS und BRANDES, 1971; BARRETT und WILLS, 1979). Daher ist es äußerst ungewiß, ob diese nach Hyperthermie beobachtete Erhöhung der lysosomalen Aktivität tatsächlich auf einer Labilisierung der Zellmembran z.B. durch eine intrazelluläre pH-Absenkung beruht oder nicht bereits ein sekundäres Phänomen der bereits stattgefundenen Zerstörung der strukturellen Integrität der Zelle durch die Hyperthermie darstellt.

Die schweren Schädigungen der Zelle während der Hyperthermie werden von einem starken K^+ -Verlust der Zelle während der Überwärmung (YI, 1979; YI et al., 1983) und von einer intrazellulären Anhäufung von Calcium (ANGHILIERI et al., 1985) während dieser Zeit begleitet. Es ist wahrscheinlich, daß eine intrazelluläre Azidifizierung auch bei den Veränderungen der intrazellulären Ionenverhältnisse, z.B. über eine Veränderung membranständiger Ionenpumpen, eine wesentliche Rolle spielt.

Unter der angewandten Wärmedosis ändert sich der Gewebe-pH-Wert in subkutanem Gewebe nicht. Diese Tatsache steht in Übereinstimmung mit Befunden von SONG et al. (1980a). Da die Gewebe am Ort der Tumorumplantation oder -entstehung, d.s. Subkutis oder Skelettmuskulatur, auf eine Überwärmung mit einer Durchblutungssteigerung reagieren, solange nicht Gewebetemperaturen von 45°C , Hyperthermiezeiten von 60 Minuten und Aufheizraten von $0,7^{\circ}$ überschritten werden (zusammenfassende Darstellung s. VAUPEL und KALLINOWSKI, 1985), ist auch kein Absinken des mittleren pH-Wertes in subkutanem Gewebe unter der angewandten Überwärmungsbehandlung zu erwarten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Xenotransplantation menschlichen Tumorgewebes auf thymusaplastische, daher T-Lymphozyten-defiziente (rnu/rnu)-Ratten ermöglicht zum ersten Mal die systematische Untersuchung von pH-Verteilungen in menschlichem Tumorgewebe in situ unter kontrollierten systemischen Bedingungen. Untersucht wird Gewebe von menschlichen Mammakarzinomen wegen der Häufigkeit dieser Tumoren und ihrer problematischen klinischen Prognose. Vergleichend wird die Messung von pH-Verteilungen in einem isotransplantierten Nagetiertumor, dem Yoshida-Sarkom sowie in benignen und malignen Spontantumoren von Nagetieren durchgeführt. Zusätzlich werden die pH-Verteilungen in der Subkutis und in der Skelettmuskulatur von Ratten gemessen, da diese Gewebe den Ort der Implantation bzw. das Wirtsgewebe bei ausgedehntem Tumorwachstum darstellen.

Unter Normothermie findet man in allen untersuchten Tumoren im Vergleich zu den in der Skelettmuskulatur oder in der Subkutis gemessenen pH-Werten eine Gewebeazidose. Etwa 70% der in 36 Xenotransplantaten eines medullären menschlichen Mammakarzinomes gemessenen 2633 pH-Werte liegen unterhalb pH 7,0. Die pH-Werte verteilen sich um einen mittleren pH-Wert von 6,81 (Standardabweichung: $\pm 0,25$). Auch in 30 isotransplantierten Yoshida-Sarkomen werden über 70 % der 1336 gemessenen pH-Werte unterhalb pH 7,0 gefunden (mittlerer pH-Wert: 6,87 $\pm 0,21$). Vergleichbare pH-Verteilungen finden sich auch in malignen Spontantumoren der Ratte. Im Vergleich zu diesen Tumoren ist die pH-Verteilung in dem untersuchten Plattenepithelkarzinom der menschlichen Brustdrüse zu höheren Werten verschoben, liegt aber noch deutlich unter derjenigen des Normalgewebes. 60 % der in den 24 Xenotransplantaten des untersuchten Plattenepithelkarzinoms gemessenen 1580 pH-Werte liegen oberhalb pH 7,0 (mittlerer pH-Wert: 7,04 $\pm 0,19$). Die Verschiebung der pH-Verteilung in

dem untersuchten Plattenepithelkarzinom geht mit dem Auftreten von regressiven Veränderungen und von Nekrosen bereits in frühen Wachstumsstadien einher. Diese Veränderungen lassen sich auf Stoffwechselbesonderheiten des untersuchten Tumors zurückführen.

Dysplasien zeigen einen Trend zu pH-Werten, die unter denen des Normalgewebes, aber über denen maligner Tumoren liegen.

An den untersuchten isotransplantierten Yoshida-Sarkomen kann gezeigt werden, daß das Tumorzentrum im Mittel 0,17 pH-Einheiten saurer als die Tumorperipherie ist. Jedoch können ausgeprägte Inhomogenitäten der pH-Verteilungen innerhalb eines Tumors und zwischen Tumoren beobachtet werden. Mit ansteigendem Tumorgewicht besteht bei den untersuchten Mammakarzinomen zunächst ein Trend zu einer pH-Absenkung bei kleinen Tumoren, die von einem pH-Anstieg bei höheren Tumorgewichten gefolgt ist. Dagegen ist bei den Yoshida-Sarkomen das Ausmaß der Gewebezidose vom Tumorgefüchtgewicht weitestgehend unabhängig.

Direkt nach einer lokalisierten Ultraschallhyperthermie von 44°C für 60 Minuten wird in allen untersuchten Tumortypen im Gegensatz zum subkutanen Gewebe ein Absinken der Gewebe-pH-Werte beobachtet. Die Verstärkung der Tumorzidose unter der Hyperthermie hängt von der untersuchten Zelllinie, der Tumorgroße und der Temperaturänderung pro Zeit während der Aufwärmphase der Hyperthermie (Aufheizrate) ab. So wird bei 36 Yoshida-Sarkomen (1784 pH-Werte), die mit Aufheizraten von 1,5°C/min erwärmt wurden, direkt nach einer lokalisierten Ultraschallüberwärmung von 44°C für 60 Minuten eine pH-Absenkung um 0,16 pH-Einheiten beobachtet. Am deutlichsten ist die Verstärkung der Zidose bei etwa 2,4 g schweren Sarkomen ausgeprägt. In diesen Tumoren sinkt der mittlere pH-Wert unter den angegebenen Bedingungen um 0,26

pH-Einheiten gegenüber einer Absenkung um 0,11 pH-Einheiten bei ca. 4 g schweren Yoshida-Sarkomen. Bei 1,4 g schweren Yoshida-Sarkomen wird unter diesen Bedingungen praktisch keine pH-Absenkung beobachtet. Weiterhin ist bei den Yoshida-Sarkomen die Verstärkung der Tumorazidose in der Tumorpherie unter einer lokalisierten Ultraschallhyperthermie von 44°C für 60 Minuten etwas stärker ausgeprägt als im Tumorzentrum. Der Einfluß der Aufheizrate wird an etwa 2,4 g schweren Yoshida-Sarkomen untersucht. Bei 16 Yoshida-Sarkomen (904 pH-Werte), die mit einer Aufheizrate $> 1,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erwärmt wurden, wird nach der Hyperthermiebehandlung - wie angegeben - eine pH-Absenkung um 0,26 pH-Einheiten gefunden. Nach einer Überwärmungsbehandlung von 10 Yoshida-Sarkomen vergleichbaren Tumorgewichtes (695 pH-Werte), die mit Aufheizraten $< 0,7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erwärmt wurden, wird demgegenüber eine Intensivierung der Tumorazidose um 0,4 pH-Einheiten beobachtet.

Aufgrund dieses Befundes wurden die Xenotransplantate menschlicher Mammakarzinome mit Aufheizraten kleiner $0,7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erwärmt, um die größtmögliche Hyperthermiewirkung zu erzielen. Unter diesen Bedingungen wird bei 13 untersuchten Xenotransplantaten eines Plattenepithelkarzinoms der menschlichen Brustdrüse (972 pH-Werte) eine pH-Absenkung um 0,2 pH-Einheiten beobachtet. Hingegen wird bei den 32 untersuchten Xenotransplantaten eines medullären menschlichen Mammakarzinoms (2291 pH-Werte) nur eine geringe Verstärkung der Tumorazidose um 0,07 pH-Einheiten gefunden. Bei diesem Tumor läßt sich wie bei den Yoshida-Sarkomen ein Einfluß der Tumorgroße auf die Änderung des Tumor-Gewebe-pH-Wertes nachweisen. So beträgt die pH-Absenkung bei 2,9 g schweren Xenotransplantaten 0,1 pH-Einheiten, wohingegen bei großen medullären Xenotransplantaten mit Gewichten um 6,8 g praktisch keine pH-Änderung beobachtet wird.

Während der Hyperthermie bildet sich ein interstitielles Ödem in den Tumoren und in dem subkutanen Gewebe um die Tu-

moren aus. Für die untersuchten Yoshida-Sarkome wird gezeigt, daß mit zunehmender Tumorgroße das Ausmaß des unter der Hyperthermie entstehenden Ödems abnimmt.

Bei den 30 untersuchten Yoshida-Sarkomen (1467 pH-Werte) werden einen Tag nach der Überwärmung nur noch diskrete Veränderungen der pH-Verteilungen gefunden. Die Schwellung der tumorfreien und der tumortragenden Rattenpfote ist deutlich zurückgegangen.

Während der Überwärmung von tumorfreien und von tumortragenden Pfoten wird initial eine Steigerung des mittleren arteriellen Blutdruckes beobachtet. Diese Blutdrucksteigerung ist von einer Erhöhung der mittleren arteriellen Glukosekonzentration begleitet. Bei der Überwärmung von Tumoren, die in die Flanke der Ratten implantiert sind, wird keine Veränderung des mittleren arteriellen Blutdruckes beobachtet.

6. LITERATUR

1. ACKER H, HOLTERMANN G, CARLSSON J, NYLEN T, NEDER T (1984) pH-gradients in glioma and thyroid cancer spheroids. Strahlentherapie 160: 52
2. ADAM G, NEUMANN HA, ENGELHARDT R, KLUTHE R, LÖHR GW (1985) Changes of amino acids in K 562 cells and in normal bone marrow progenitor cells (CFU-C) under 40.5 °C hyperthermia. Strahlentherapie 161: 523
3. ADAMSONS K, DANIEL SS, GANDY G, JAMES LS (1964) Influence of temperature on blood pH of the human adult and newborn. J Appl Physiol 19: 897-900
4. ALBERS C, KERCKHOFF W van den, VAUPEL P, MÜLLER-KLIESER W (1981) Effect of CO₂ and lactic acid on intracellular pH of ascites tumor cells. Respir Physiol 45: 273-285
5. ANGHILIERI LJ (1975) Tumor growth inhibition by ammonium chloride - induced acidosis. Int J Clin Pharmacol 12: 320-326
6. ANGHILIERI LJ, ESCANYE MC, MARCHAL C, ROBERT J (1985) Calcium, calcium-ATPase and cyclic AMP changes in Ehrlich ascites cells submitted to hyperthermia. Arch Geschwulstforsch 55: 171-175
7. ARCANGELI G, MAURO F (eds.) (1980) Hyperthermia in radiation oncology. Masson, Milano
8. ARDENNE M von, REITNAUER PG (1976) Verstärkung der mit Glukoseinfusion erzielbaren Tumorübersäuerung in vivo durch NAD. Arch Geschwulstforsch 46: 197-203

9. ARDENNE M von, REITNAUER PG (1978) Amplification of the selective tumor acidification by local hyperthermia. *Naturwissenschaften* 65: 159
10. ARDENNE M von, REITNAUER PG (1979) Verstärkung der mit Glukoseinfusion erzielbaren Tumorübersäuerung durch lokale Hyperthermie. *Res exp Med* 175: 7-18
11. ARDENNE M von, LIPPMANN HG, REITNAUER PG, JUSTUS J (1979) Histological proof for selective stop of microcirculation in tumor tissue at pH 6,1 and 41°C. *Naturwissenschaften* 66: 59-60
12. ASHBY BS (1966) pH studies in human malignant tumors. *Lancet* 2: 312-315
13. BALABAN RS (1984) The application of nuclear magnetic resonance to the study of cellular physiology. *Am J Physiol* 246: C10-C19
14. BARNIKOL WKR, BURKHARD O (1985) Die Abhängigkeit der Erythrozyten-Deformierbarkeit von der Osmolarität, dem pH-Wert, der Temperatur und der Proteinkonzentration. *Funkt Biol Med* 4: 55-60
15. BARRETT GM, WILLS ED (1979) The effect of hyperthermia and radiation on lysosomal enzyme activity of mouse mammary tumours. *Europ J Cancer* 15: 243-250
16. BASTERT GB, FORTMEYER HP, SCHMIDT-MATTHIESEN H(eds.) (1981) Thymusaplastic nude mice and rats in clinical oncology. Fischer, Stuttgart, New York
17. BEER-GABEL M, YERUSHALMI A (1981) Altered glucose metabolism in intact and tumor bearing rats subjected to local hyperthermia. *Bull Cancer (Paris)* 68: 321-327

18. BENETATO G (1934) Etude comparative du pH des tissus embryonnaires-adultes et des tumeurs, chez les rats. Compt rend Soc Biol (Paris) 116: 1093-1095
19. BERG-BLOK AE van den, REINHOLD HS (1984) Time-temperature relationship for hyperthermia induced stoppage of the microcirculation in tumors. Int J Radiat Oncol Biol Phys 10: 737-740
20. BERG AP van den, WIKE-HOOLEY JL, BERG-BLOK AE van den, ZEE J van der, REINHOLD HS (1982) Tumour pH in human mammary carcinoma. Eur J Cancer Clin Ocol 18: 457-462
21. BICHER HI, VAUPEL PW (1980) Physiological mechanisms of localized microwave hyperthermia. In: Arcangeli G, Mauro F (eds.) Hyperthermia in radiation oncology. Masson, Milano, pp. 95-99
22. BICHER HI, HETZEL FW, SANDHU TS, FRINAK S, VAUPEL P, O'HARA MD, O'BRIEN T (1980) Effects of hyperthermia on normal and tumor microcirculation. Radiology 137: 523-530
23. BLENDSTRUP K, KLUGE M, VAUPEL P (1985) Dynamic temperature mapping of tumors. Strahlentherapie 161: 525
24. BORK R, VAUPEL P, GÜNTHER H, THEWS G (1975) Atemgas-pH-Nomogramme für das Rattenblut bei 37 °C. Anästhesist 24: 84-90
25. BOWEN JW, LEVINSON C (1984) H⁺ transport and the regulation of intracellular pH in Ehrlich ascites tumor cells. J Membrane Biol 79: 7-18

26. BURMEISTER P, NEUMANN H, TANN M von der, ENGELHARDT R (1982) Ganzkörperhyperthermie. Der informierte Arzt 10: 28-33
27. BUSSE J, MÜLLER-KLIESER W, VAUPEL P (1981) Intratumor pH-distribution - a function of tumor growth stage? Pflügers Arch 389: R 55
28. CECCARINI C, EAGLE H (1971) pH as a determinant of cellular growth and contact inhibition. Proc Natl Acad Sci USA 68: 229-233
29. COPLEY AL (1980) Fibrinogen gel clotting, pH and cancer therapy. Thrombosis Res 18: 1-6
30. COPLEY AL, KING RG (1984) A survey of surface hemorheological experiments on the inhibition of fibrinogenin formation employing surface layers of fibrinogen systems with heparins and other substances. A contribution on antithrombogenic action. Thrombosis Res 35: 237-256
31. COUCH NP, DMOCHOWSKI JR, WATER JM van de, HARKEN DE, MOORE FD (1971) Muscle surface pH as an index of peripheral perfusion in man. Ann Surg 173: 173-183
32. DAVE S, BLENDSTRUP K, KALLINOWSKI F, VAUPEL P (1984) Blood flow and temperature distribution in peripheral subcutaneous tumors in rats. Int J Microcirc 3: 565
33. DAVE S, KALLINOWSKI F, VAUPEL P (1985) Blood flow and oxygen supply to human mammary carcinoms transplanted into nude rats. Adv exp Med Biol (im Druck)
34. DAVIDOFF MS (1981) Structure and functions of lysosomes. Medicina i Fizkultura, Sofia

35. DETHLEFSEN LA, DEWEY WC (1982) Cancer therapy by hyperthermia, drugs and radiation. Bethesda, National Cancer Institute Monograph 61
36. DEWHIRST M, SIM DA, GROSS JF, KUNDRAT MA (1984a) Effect of heating rate on tumor and normal tissue microcirculatory function. In: Overgaard J (ed.) Hyperthermic Oncology 1984. Taylor and Francis, London, Philadelphia, pp. 177-180
37. DEWHIRST MW, SIM DA, SAPARETO S, CONNOR WG (1984b) Importance of minimum tumor temperature in determining early and long-term responses of spontaneous canine and feline tumors to heat and radiation. Cancer Res 44: 43-50
38. DEWHIRST M, GROSS JF, SIM D, ARNOLD P, BOYER D (1984c) The effect of rate of heating or cooling prior to heating on tumor and normal tissue microcirculatory blood flow. Biorheology 21: 539-558
39. DICKSON JA, SUZANGAR M (1974) In vitro - in vivo studies on the susceptibility of the solid Yoshida sarcoma to drugs and hyperthermia (42 °C). Cancer Res 34: 1263-1274
40. DICKSON JA, ELLIS HA (1976) The influence of tumor volume and the degree of heating on the response of the solid Yoshida sarcoma to hyperthermia (40-42°). Cancer Res 38: 1188-1195
41. DICKSON JA, OSWALD BE (1976) The sensitivity of a malignant cell line to hyperthermia (42 °C) at low intracellular pH. Brit J Cancer 34: 262-271

42. DICKSON JA, CALDERWOOD SK (1979) Effects of hyperglycemia and hyperthermia on the pH, glycolysis, and respiration of the Yoshida sarcoma in vivo. J Natl Cancer Inst 63: 1371-1381
43. DICKSON JA, CALDERWOOD SK (1983) Thermosensitivity of neoplastic tissue in vivo. In: Storm FK (ed.) Hyperthermia in Cancer Therapy. Hall Publishers, Boston, pp. 63-140
44. DIETZEL F (1975) Tumor und Temperatur. Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien
45. DIKOMEY E, EICKHOFF J, JUNG H (1981) The effect of extracellular pH on heat-sensitivity and thermotolerance of CHO and R1H cells. Strahlentherapie 157: 617
46. DUDAR TE, JAIN RK (1984) Differential response of normal and tumor microcirculation to hyperthermia. Cancer Res 44: 605-612
47. EAGLE H (1973) The effect of environmental pH on the growth of normal and malignant cells. J Cell Physiol 82: 1-8
48. EDEN M, HAINES B, KAHLER H (1955) The pH of rat tumors measured in vivo. J Natl Cancer Inst 16: 541-556
49. EDER M, GEDIGK P (1977) Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie. Springer, Berlin, Heidelberg, New York

50. EIGENBRODT E, FISTER P, REINACHER M (1985) New perspectives on carbohydrate metabolism in tumor cells. In: Beitner R (ed.) Regulation of carbohydrate metabolism (Vol II). CRC Press, Boca Raton, pp. 141-179
51. ELLENS H, BENTZ J, SZOKA FC (1984) pH-induced destabilization of phosphatidylethanolamine - containing liposomes: role of bilayer contact. Biochemistry 23: 1532-1538
52. EMAMI B, NUSSBAUM GH, HAHN N, PIRO AJ, DRITSCHILO A, QUIMBO F (1981) Histopathological study on the effects of hyperthermia on microvasculature. Int J Radiat Oncol Biol Phys 7: 343-348
53. EMAMI B, SONG CW (1984) Physiological mechanisms in hyperthermia: a review. Int J Radiat Oncol Biol Phys 10: 289-295
54. ENDRICH B (1984) Mikrozirkulation maligner Tumoren. Effekte von Hämodilution und lokaler Hyperthermie im amelanotischen Melanom A-Mel-3 des Hamsters. Habilitationsschrift der Medizinischen Fakultät, Universität Heidelberg
55. ENDRICH B, ZWEIFACH BW, REINHOLD HS, INTAGLIETTA M (1979) Quantitative studies of microcirculatory function in malignant tissue: influence of temperature on microvascular hemodynamics during the early growth of the BA1112 rat sarcoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 5: 2021-2030

56. EVANOCHKO WT, NG TC, LILLY MB, LAWSON AJ, CORBETT TH, DURANT JR, GLICKSON JD (1983) In vivo ^{31}P NMR study of the metabolism of murine mammary 16/C adenocarcinoma and its response to chemotherapy, x-radiation, and hyperthermia. Proc Natl Acad Sci USA 80: 334-338
57. EVANOCHKO WT, NG TC, GLICKSON JD (1985) Application of in vivo NMR spectroscopy to cancer. Magnetic Resonance in Medicine (im Druck)
58. FESTING MFW, MAY D, CONNORS TA, LOVELL D, SPARROW S (1978) An athymic nude mutation in the rat. Nature 274: 365-366
59. FOGH J, BEAN MA, BRÜGGEN J, FOGH H, FOGH JM, HAMMER SP, KODERA Y, LOVELESS JD, SORG C, WRIGHT WC (1978) Comparison of a tumor cell line before and after growth in the nude mouse. In: Fogh J, Giovanella BC (eds.) The nude mouse in experimental and clinical research. Academic Press, New York, San Francisco, London, pp. 215-234
60. FOGH J, GIOVANELLA BC (1978) The nude mouse in experimental and clinical research. Academic Press, New York, San Francisco, London
61. FREEMAN ML, DEWEY WC, HOPWOOD LE (1977) Effect of pH on hyperthermic cell survival. J Natl Cancer Inst 58: 1837-1839
62. FREEMAN ML, MALCOLM AW, MEREDITH MJ (1985) Decreased intracellular glutathione concentration and increased hyperthermic cytotoxicity in an acid environment. Cancer Res 45: 504-508

63. GADIAN DG, RADDA GK, DAWSON MJ, WILKIE DR (1982) pH_i measurements of cardiac and skeletal muscle using ^{31}P -NMR. In: Nuccitelli R, Deamer DW (eds.) Intra-cellular pH: its measurement, regulation, and utilization in cellular functions. Alan R Liss, New York, pp. 61-77
64. GEBERT G, FRIEDMAN SM (1973) An implantable glass electrode used for pH measurement in working skeletal muscle. J Appl Physiol 34: 122-124
65. GERWECK LE, JENNINGS M, RICHARDS B (1980) Influence of pH on the response of cells to single and split dose of hyperthermia. Cancer Res 40: 4019-4024
66. GERWECK LE, RICHARDS B (1981) Influence of pH on the thermal sensitivity of cultured human glioblastoma cells. Cancer Res 41: 845-849
67. GERWECK LE, DAHLBERG WK, EPSTEIN LF, SHIMM DS (1984) Influence of nutrient and energy deprivation on cellular response to single and fractionated heat treatments. Radiat Res 99: 573-581
68. GILLIES RJ, DEAMER DW (1979) Intracellular pH: methods and applications. Current Topics Bioenergetics 9: 63-87
69. GILLIES RJ, OGINO T, SHULMAN RG, WARD DC (1982) ^{31}P Nuclear magnetic resonance evidence for the regulation of intracellular pH by Ehrlich ascites tumor cells. J Cell Biol 95: 24-28
70. GOLDFEDER A (1929) Über die in bösartigen Geschwülsten vorkommenden pH-Werte. Z Krebsforsch 29: 134-146

71. GOLDFEDER A, PARTRIDGE HM, BOWLES JAC (1934) Untersuchungen über den Einfluß von Säuremitteln auf die aktuelle Reaktion der normalen und malignen Gewebe mittels der Glaselektrode. Z Krebsforsch 40: 186-191
72. GONZALEZ-MENDEZ R, WEMMER D, HAHN G, WADE-JARDETZKY N, JARDETZKY O (1982) Continuous-flow NMR culture system for mammalian cells. Biochem Biophys Acta 720: 274-280
73. GRAY LH (1961) Radiobiologic basis of oxygen as a modifying factor in radiation therapy. Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med 85: 803-815
74. GRAY LH, CONGER AD, EBERT M, HORNSEY S, SCOTT OAC (1953) The concentration of oxygen dissolved in tissues on the time of irradiation as a factor in radiotherapy. Br J Radiol 26: 638-648
75. GRIFFITHS JR, STEVENS AN, ILES RA, GORDON RE, SHAW D (1981) ³¹P-NMR investigation of solid tumors in the living rat. Biosci Rep 1: 319-325
76. GROVEMAN DS, BORDEN EC, MERRIT JA, ROBINS HI, STEEVES R, BRYAN GT (1984) Augmented antiproliferative effects of interferons at elevated temperatures against human bladder carcinoma cell lines. Cancer Res 44: 5517-5521
77. GULLINO PM (1975) Extracellular compartments of solid tumors. In: Becker FF (ed.) Cancer 3. Plenum Press, New York, pp. 327-354
78. GULLINO PM, GRANTHAM FH, SMITH SH, HAGGERTY AC (1965) Modifications of the acid-base status of the internal milieu of tumors. J Natl Cancer Inst 34: 857-869

79. GULLINO PM, GRANTHAM FH, LOSONCZY I, BERGHOFFER B (1972) Mammary tumor regression. III. Uptake and loss of substrates by regressing tumors. J Natl Cancer Inst 68: 519-533
80. GULLINO PM, JAIN RK, GRANTHAM FH (1982) Temperature gradients and local perfusion in a mammary carcinoma. J Natl Cancer Inst 68: 519-533
81. HAHN GM (1982) Hyperthermia and cancer. Plenum Press, New York, London
82. HAHN GM, SHIU EC (1983) Effect of pH and elevated temperatures on the cytotoxicity of some chemotherapeutic agents on Chinese hamster cells in vitro. Cancer Res 43: 5789-5791
83. HALL EJ (1978) Radiobiology for the radiologist. Harper and Row, Publishers Hagerstown, New York, Evanston, San Francisco, London
84. HAMPE JF, MISDORF W (1974) Tumors and dysplasias of the mammary gland. Bull Wld Org 50: 111-133
85. HAND JW, HAAR G ter (1981) Heating techniques in hyperthermia. I. Introduction and assessment of techniques. Brit J Radiol 54: 443-466
86. HARDE E, DANYSZ-MICHEL M (1926) Sur la réaction acide des tumeurs. Compt rend Soc Biol 95: 1489-1490
87. HARDE E, HENRI P (1927a) Sur le pH relatif des tissus des mammifères étudié in vivo et son rôle possible dans la genèse des tumeurs. Ann Institut Pasteur (Paris) 41: 1022-1035

88. HARDE E, HENRI P (1927b) Sur le pH des néoplasmes et des embryons de souris déterminé par la coloration vitale. *Compt rend Soc Biol (Paris)* 96: 535-536
89. HARGUINDEY S, HENDERSON ES, NAEHER C (1979) Effects of systemic acidification of mice with sarcoma 180. *Cancer Res* 39: 4364-4371
90. HARRISON DK, WALKER WF (1979) Micro-electrode measurement of skin pH in humans during ischemia, hypoxia and local hypothermia. *J Physiol* 291: 339-350
91. HAVEMAN J (1979) The pH of the cytoplasm as an important factor in the survival of in vitro cultured malignant cells after hyperthermia. Effects of carbonylcyanide 3-chlorophenylhydrazone. *Europ J Cancer* 15: 1281-1288
92. HAVEMAN J, HAHN GM (1981) The role of energy in hyperthermia induced mammalian cell inactivation: A study of the effects of glucose starvation and an uncoupler of oxidative phosphorylation. *J Cell Physiol* 107: 237-241
93. HEINZ A, SACHS G, SCHAEFER JA (1981) Evidence for activation of an active electrogenic proton pump in Ehrlich ascites tumor cells during glycolysis. *J Membrane Biol* 61: 143-153
94. HINSULL SM, COLSON RH, FRANKLIN A, WATSON BW, BEL-LAMY D (1984) Determination of extracellular pH and tissue temperature in transplantable rat tumors by use of inductive loop telemetry. *J Natl Cancer Inst* 73: 463-468

95. HOFER KG, MIVECHI NF (1980) Tumor cell sensitivity to hyperthermia as a function of intracellular pH. J Natl Cancer Inst 65: 621-625
96. HORNBACK NB (1984) Hyperthermia and cancer: Human clinical trial experience. Vol I/II: CRC Press, Boca Raton
97. INCH WR (1954) Direct current potential and pH of several varieties of skin neoplasms. Can J Biochem Physiol 32: 519-525
98. IRVING MG, SIMPSON SJ, FIELD J, DODDRELL DM (1985) Use of high-resolution ^{31}P -labeled topical magnetic resonance spectroscopy to monitor in vivo tumor metabolism in rats. Cancer Res 45: 481-486
99. JAIN RK (1980) Temperature distributions in normal and neoplastic tissues during normothermia and hyperthermia. Ann NY Acad Sci 335: 48-66
100. JAIN RK, GULLINO PM (1980) Thermal characteristics of tumors: Applications in detection and treatment. NY Academy Sciences, New York
101. JAIN RK, SHAH SA, FINNEY PL (1984) Continuous non-invasive monitoring of pH and temperature in rat Walker 256 carcinoma during normoglycemia and hyperglycemia. J Natl Cancer Inst 73: 429-436
102. JÄHDE E, RAJEWSKY MF (1982) Tumor-selective modification of cellular microenvironment in vivo: effect of glucose infusion on the pH in normal and malignant rat tissues. Cancer Res 42: 1505-1512

103. JÄHDE E, RAJEWSKY MF, BAUMGÄRTL H (1982) pH distributions in transplanted neural tumors and normal tissues of BDIX rats as measured with pH microelectrodes. *Cancer Res* 42: 1498-1504
104. JETER JR, CAMERON IL, PADILLA GM, ZIMMERMANN AM (eds.) (1978) *Cell cycle regulation*. Academic Press, New York, San Francisco, London
105. JOOS G (1930) Die aktuelle Blut- und Gewebsreaktion des normalen und krebserkrankten Organismus und ihr Verhalten bei experimenteller Azidose. *Frankfurter Zsch Pathol* 39: 254-276
106. JUNGERMANN K, MÖHLER H (1980) *Biochemie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York
107. KÄHLER H, MOORE B (1962) pH of rat tumors and some comparisons with the Lissamine-green circulation test. *J Natl Cancer Inst* 28: 561-568
108. KÄHLER H, ROBERTSON WVB (1943) Hydrogen-ion concentration of normal liver and hepatic tumors. *J Natl Cancer Inst* 3: 495-501
109. KALLINOWSKI F, DAVE S, VAUPEL P, FÖRSTER H (1984a) Aminosäuren- und Fettsäureumsatz in Mammakarzinomen des Menschen (Heterotransplantate in Nacktratten). *Pflügers Arch (Suppl)* 402: R 12
110. KALLINOWSKI F, VAUPEL P, SCHÄFER C, BENZING H, MÜLLER-SCHAUENBURG W, FORTMEYER HP (1984b) Hyperthermia-induced blood flow changes in human mammary carcinomas transplanted into nude (rnu/rnu) rats. In: Overgaard J (ed.) *Hyperthermic Oncology 1984*. Taylor and Francis, London, Philadelphia, pp. 133-136

111. KALLINOWSKI F, DAVE S, VAUPEL P (1985a) Blood flow and oxygen consumption of primary and xenotransplanted human mammary carcinomas. In: Kallman RF (ed.) Rodent tumors in experimental cancer therapy. Pergamon Press (im Druck)
112. KALLINOWSKI F, DAVE S, VAUPEL P, BÄSSLER KH, WAGNER K (1985b) Glucose, lactate, and ketone body utilization by human mammary carcinomas in vivo. Adv exp Med Biol (im Druck)
113. KALLINOWSKI F, DAVE S, VAUPEL P, FORTMEYER HP, FÖRSTER H, HOOS I (1985c) Modulation of ammonia detoxification in certain human tumors. Infusionstherapie 12: 22
114. KALLINOWSKI F, VAUPEL P (1986) Concurrent measurements of O₂ partial pressures and pH values in human mammary carcinoma xenotransplants. Adv exp Med Biol (im Druck)
115. KAMPSCHMIDT RF, WELLS D (1968) Acid hydrolase activity during the growth, necrosis, and regression of the Jensen sarcoma. Cancer Res 28: 1938-1943
116. KAYE SB (1981) Liposomes-problems and promise as selective drug carriers. Cancer Treatment Reviews 8: 27-50
117. KIELER J (1960) Influence of CO₂ tension on the respiration of Yoshida ascites cells. J Natl Cancer Inst 25: 161-176
118. KIM H, KIM HJ, HAHN W, ENSIGN NA (1980) Selective killing of glucose and oxygen-deprived HeLa cells by hyperthermia. Cancer Res 40: 3459-3462

119. KNOP RH, CHEN CW, MITCHELL JB, RUSSO A, McPHERSON S, COHEN JS (1985) Adaptive cellular response to hyperthermia: ^{31}P -NMR studies. *Biochim Biophys Acta* 845: 171-177
120. KOEZE TH, LANTOS PL, ILES RA, GORDON RE (1984) In vivo nuclear magnetic resonance spectroscopy of a transplanted brain tumor. *Br J Cancer* 49: 357-361
121. KOMITOWSKI D, SASS B, LAUB W (1982) Rat mammary tumor classification: notes on comparative aspects. *J Natl Cancer Inst* 68: 147-156
122. KRAUS W, FIEBIG HH, SCHUCHHARDT C, KOCH H, STRECKER EP (1983) Mikroangiographische Untersuchungen verschiedener menschlicher Tumoren nach Transplantation auf thymusaplastische Nacktmäuse. *Res Exp Med* 182: 63-70
123. KRULWICH TA (1983) Na^+/H^+ antiporters. *Biochim Biophys Acta* 726: 245-264
124. LEE SY, RHEE JG, SONG CW, LEVITT SH (1985) Effect of hyperthermia on the lactic acid and β -hydroxybutyric acid content in tumors. 33rd Ann Meet Radiat Res Soc, Los Angeles, Abstract Fa 33
125. LEFOR AT, MAKOHON S, ACKERMANN NB (1985) The effects of hyperthermia on vascular permeability in experimental liver metastasis. *J Surg Oncol* 28: 297-300
126. LELE PP (1985) Ultrasound: is it the modality of choice for controlled, localized heating of deep tumors? In: Overgaard J (ed.) *Hyperthermic Oncology 1985*, Bd. II, Taylor und Francis, London, Philadelphia, pp. 129-154

127. LEVINSON R, HOUSMAN D, CANTLEY L (1980) Amiloride inhibits murine erythroleukemia cell differentiation: evidence for a Ca^{2+} requirement for commitment. Proc Natl Acad Sci USA 77: 5948-5952
128. LI DJ, HAHN GM (1984) Responses of RIF tumors to heat and drugs: dependence on tumor size. Cancer Treatment Reports 68: 1149-1151
129. LIERKE EG, GROSSBACH R, SUDHOF H, MÜLLER-KLIESER W, VAUPEL P (1982) A feedback control system for localized ultrasonic hyperthermia in tumors. I. Technical and functional description of equipment. Strahlentherapie 158: 386
130. LILLY MB, NG TC, EVANOCHKO WT, KATHOLI CR, KUMAR NG, ELGAVISH GA, DURANT JR, HIRAMOTO R, GHANTA V, GLICKSON JD (1984) Loss of high-energy phosphate following hyperthermia demonstrated by in vivo ^{31}P -nuclear magnetic resonance spectroscopy. Cancer Res 44: 633-638
131. MAGATH MA (1929) Zur Frage nach der Reaktionsverschiebung in röntgenbestrahlten Geweben. Strahlentherapie 32: 534-549
132. MAXWELL LC, BISCHOFF F (1930) Studies in cancer chemotherapy. VIII. The reaction of the fluid of rat sarcoma 10. J Pharmacol and Exptl Therapeut 40: 1-5
133. MCGOVERN MORONEY P, SCHOLLES TA, HICKLE PC (1984) Effect of membrane potential and pH gradient on electron transfer in cytochrome oxidase. Biochemistry 23: 4991-4997

134. MEYER KA, KAMMERLING EM, AMTMANN L, KOLLER M, HOFFMANN SJ (1948) pH studies in malignant tissues in human beings. *Cancer Res* 8: 513-518
135. MILLET H (1923) Measurements of the pH of normal, fetal, and neoplastic tissues by means of the glass electrode. *J Biol Chem* 78: 281-288
136. MOOLENAAR WH, BOONSTRA J, SAAG PT van der, LAAT SW de (1981) Sodium/proton exchange in mouse neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 256: 12883-12887
137. MÜLLER-KLIESER W, VAUPEL P (1984) Effect of hyperthermia on tumor blood flow. *Biorheology* 21: 529-538
138. MÜLLER-KLIESER W, BUSSE J, VAUPEL P (1981) Tissue pH-distribution within malignant tumors as measured with antimony microelectrodes. *Adv Physiol Sci* 25: 253-254
139. MÜLLER-KLIESER W, LIERKE EG, VAUPEL P (1982) A feedback control system for localized ultrasonic hyperthermia in tumors. II. Application and first experiments in DS-Carcinosarcoma. *Strahlentherapie* 158: 387
140. MÜLLER-KLIESER W, MANZ R, OTTE J, VAUPEL P (1984) Effect of localized hyperthermia on tumor blood flow and oxygenation. In: Francis E, Ring J, Phillips P (eds.) *Recent advances in medical thermology*. Plenum Press, New York, pp. 669-676
141. MURPHY JR (1967) The influence of pH and temperature on some physical properties of normal erythrocytes and erythrocytes from patients with hereditary spherocytosis. *J Lab Clin Med* 69: 758-775

142. NAESLUND J, SWENSON KE (1953) Investigations on the pH of malignant tumors in mice and humans after the administration of glucose. Acta Obstet Gynecol Scand 32: 359-367
143. NASH GB, MEISELMAN HJ (1985) Alteration of red cell membrane viscoelasticity by heat treatment: effect on cell deformability and suspension viscosity. Biorheology 22: 73-84
144. NAVON G, OGAWA S, SHULMAN RG, YAMANE T (1977) ³¹P Nuclear magnetic resonance studies of Ehrlich ascites tumor cells. Proc Natl Acad Sci 74: 87-91
145. NAVON G, NAVON R, SHULMAN RG, YAMANE T (1978) Phosphate metabolites in lymphoid, Friend erythroleukemia, and HeLa cells observed by high-resolution ³¹P nuclear magnetic resonance. Proc Natl Acad Sci USA 75: 891-895
146. NG TC, EVANOCHKO WT, HIRAMOTO RN, GHANTA VK, LILLY MB, LAWSON AJ, CORBETT TH, DURANT JR, GLICKSON JD (1982) ³¹P-NMR spectroscopy of in vivo tumors. J Magnet Res 49: 271-286
147. NIELSON OS, OVERGAARD J (1979) Effect of extracellular pH on thermotolerance and recovery of hyperthermic damage in vitro. Cancer Res 39: 2772-2778
148. NISSEN NI (1960) Influence of CO₂ on respiratory metabolism of Ehrlich ascites tumor. Proc Soc Exp Biol Med 104: 446-448
149. NISSEN E, TANNEBERGER S (1981) Influence of pH and serum on the effectivity of antineoplastic agents in vitro. Arch Geschulstforsch 51: 152-156

150. NUCCITELLI R, DEAMER DW (1982) Intracellular pH: its measurement, regulation, and utilization in cellular functions. Alan R Liss, New York
151. NUCCITELLI R, WEBB DJ, LAGIER ST, MATSON GB (1981) ³¹P NMR reveals increased intracellular pH after fertilization in Xenopus eggs. Proc Natl Acad Sci USA 78: 4421-4425
152. NUSSBAUM GH (1982) Physical aspects of hyperthermia. Medical Physics Monograph No. 8
153. O'DONNELL TF (1975) Measurement of percutaneous muscle surface pH. Lancet 2: 533
154. OHKUMA S, POOLE B (1978) Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. Proc Natl Acad Sci USA 75: 3327-3331
155. OKUNEFF N (1933) Über das Säure- Basengleichgewicht bei den Prozessen des Tumorwachstums. Z Krebsforsch 38: 283-288
156. OVERGAARD J (1976a) Influence of extracellular pH on the viability and morphology of tumor cells exposed to hyperthermia. J Natl Cancer Inst 56: 1243-1250
157. OVERGAARD J (1976b) Ultrastructure of a murine mammary carcinoma exposed to hyperthermia in vivo. Cancer Res 36: 983-995
158. OVERGAARD J (1983) Histopathologic effects of hyperthermia. In: Storm FK (ed.) Hyperthermia in cancer therapy. Hall Medical Publishers, Boston, pp. 163-185

159. OVERGAARD J (1984/85) Hyperthermic Oncology, Vol. I/II, Francis and Taylor, London, Philadelphia
160. OVERGAARD J, NIELSON OS (1980) The role of tissue environmental factors on the kinetics and morphology of tumor cells exposed to hyperthermia. Ann NY Acad Sci 335: 254-278
161. OVERGAARD J, SKOVGAARD PH (1977) Effect of hyperthermia and environmental acidity on the lysosomal activity in murine ascites tumor cells. J Natl Inst 58: 1159-1161
162. OUTZEN HC, CUSTER RP (1975) Growth of human normal and neoplastic mammary tissues in the cleared fat pad of the nude mouse. J Natl Cancer Inst 55: 1461-1466
163. PAMPUS F (1963) Die Wasserstoffionenkonzentration des Hirngewebes bei raumfordernden intracraniellen Prozessen. Acta neurochir (Wien) 11: 305-318
164. PARIS JE, BRANDES D (1971) Effect of x-irradiation on the functional status of lysosomal enzymes of mouse mammary gland carcinomas. Cancer Res 31: 392-401
165. PARTRIDGE HM, BOWLES JAC, GOLDFEDER A (1934) Determination of the pH of normal and malignant tissues with the glass electrode and vacuum tube null indicator. J Lab Clin Med 19: 1100-1105
166. POOLE DT (1967) Intracellular pH of the Ehrlich ascites tumor cell as it is affected by sugars and sugar derivatives. J Biol Chem 242: 3731-3736

167. POOLE DT, BUTLER TC, WADDELL WJ (1964) Intracellular pH of the Ehrlich ascites tumor cell. J Natl Cancer Inst 32: 939-946
168. RAHN H, REEVES RB, HOWELL BJ (1974) Intra- and extracellular pH as a function of body temperature. Proc Int Union Physiol Sci 10: 56-57
169. RAJARATNAM S, ADAMS GE, STRATFORD IJ, CLARKE C (1982) Enhancement of the cytotoxicity of radiosensitizers by modest hyperthermia: the electron affinity relationship. Br J Cancer 46: 912-917
170. RAKOW AI, HOCHMUTH RM (1975) Effect of heat treatment on the elasticity of human erythrocyte membrane. Biophys J 15: 1095-1100
171. RAUEN HM, FRIEDRICH M, NORPOTH K (1968) Die Beziehung zwischen Milchsäurekonzentration und Gewebs-pH beim DS- Carcinosarkom der Ratte. Z Naturforsch 23 b: 1018-1020
172. RAUEN HM, NORPOTH K, WENDERDEL P, BÖHM E, HUSEN N van (1969) Metabolitanalysen bei schnell wachsenden DS-Carcinosarkomen der Hühner-Chorioallantois. Z Krebsforsch 72: 88-101
173. REEVES RB (1976) Temperature - induced changes in blood acid - base status: pH and $p\text{CO}_2$ in a binary buffer. J Appl Physiol 40: 752-761
174. REIJNGOUD DJ, TAGER JM (1977) The permeability properties of the lysosomal membrane. Biochim Biophys Acta 472: 419-449

175. REINHOLD HS, BERG-BLOK AE van den (1985) Microcirculation response of a human colon carcinoma xenograft in sandwich observation chambers. *Strahlentherapie* 161: 547
176. REINHOLD HS, WIKE-HOOLEY JL, BERG-BLOK AP van den, BERG-BLOK A van den (1985) Environmental factors, blood flow and microcirculation. In: Overgaard J (ed.) *Hyperthermic Oncology*, Vol. II, Taylor and Francis, London, Philadelphia
177. RHEE JG, KIM TH, LEVITT SH, SONG CW (1984) Changes in acidity of mouse tumor by hyperthermia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10: 393-399
178. RHEE JG, LEVITT SH, SONG CW, URANO M (1985) Intratissue pH and hyperglycemia in tumors and normal tissues. 33rd Ann Meet Radiat Res Soc, Los Angeles, Abstract Fa 27
179. ROBSON JS, BONE JM, LAMBIE AT (1968) Intracellular pH. *Adv Clin Chem* 11: 213-275
180. ROOS A, BORON WF (1981) Intracellular pH. *Physiol Rev* 61: 296-434
181. ROSENTHAL TB (1948) The effect of temperature on the pH of blood and plasma in vitro. *J Biol Chem* 173: 25-30
182. ROTHENBERG P, GLASER L, SCHLESINGER P, CASSEL D (1983) Activation of Na^+/H^+ exchange by epidermal growth factor elevates intracellular pH in A431 cells. *J Biol Chem* 258: 12644-12653

183. ROTTER W (Hrsg.) (1972) Lehrbuch der Pathologie für den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Bd. I. Schattauer, Stuttgart, New York
184. RÖTTINGER EM, MENDONCA M , GERWECK LE (1980) Modification of pH induced cellular inactivation by irradiation - glial cells. Int J Radiat Oncol Biol Phys 6: 1659-1662
185. RÖTTINGER EM, MENDONCA M (1982) Radioresistance secondary to low pH in human glial cells and Chinese hamster ovary cells. Int J Radiat Oncol Biol Phys 8: 1309-1314
186. RYU HL, SONG CW, KANG MS, LEVITT SH (1982) Changes in lactic acid content by hyperthermia. 2nd Ann Meet North American Hyperthermia Group, Salt Lake City, Abstract Nr. 112
187. SANDRITTER W, BENEKE G (1974) Allgemeine Pathologie. Schattauer, Stuttgart, New York
188. SAUER LA, STAYMAN JW, DAUCHY RT (1982) Amino acid, glucose, and lactic acid utilization in vivo by rat tumors. Cancer Res 42: 4090-4097
189. SCHEID P (1961) Funktionale Besonderheiten der Mikrozkulation im Karzinom. Bibl anat 1: 327-335
190. SCHEID P, KUNZE P (1962) Continuous vital pH-measurement in animal tumors under (additional) metabolic stress. Acta Univers Inst Cancer 18: 256-258
191. SCHERER E (1981) Strahlentherapie. Eine Einführung in die klinische Onkologie. 3. Auflage, Thieme, Stuttgart, New York

192. SCHLOERB PR, BLACKBURN GL, GRANTHAM JJ, MALLARD DS, CAGE GK (1965) Intracellular pH and buffering capacity of the Walker-256 carcinoma. *Surgery* 58: 5-11
193. SCHMIDT CG (1962) Über Metabolitkonzentrationen in Jensen-Geschwülsten in Abhängigkeit vom Tumoralter. *Z Krebsforsch* 65: 121-129
194. SCHMID-SCHÖNBEIN H, SINGH M, MALOTTA H, LESCHKE D, TEITEL P, DRIESSEN G, SCHEIDT-BLEICHERT H (1984) Subpopulations of rigid red cells in hyperthermia and acidosis: Effect on filtrability in vitro and on nutritive capillary perfusion in the mesenteric microcirculation. *Int J Microcirc Clin Exp* 3: 497
195. SCHMÄHL D (1981) Maligne Tumoren. Entstehung-Wachstum-Chemotherapie. 3. Auflage, Editio Cantor, Aulendorf
196. SCHULDINER S, ROZENGURT E (1982) Na^+/H^+ antiport in Swiss 3T3 cells: mitogenic stimulation leads to cytoplasmic alkalinization. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 7778-7782
197. SEEGER PG (1939) Die Unterschiede zwischen normalen Exsudatzellen und Tumorasцитезellen der Maus hinsichtlich ihres vitalfärberischen und mikrochemischen Verhaltens. *Arch exp Zellforsch* 22: 356-366
198. SHAMBERGER RJ (1969) Lysosomal enzyme changes in growing and regressing mammary tumors. *Biochem J* 111: 375-383
199. SHAPOT VS (1980) Biochemical aspects of tumor growth. MIR Publishers, Moscou

200. SHULMAN RG, BROWN TR, UGURBIL K, OGAWA S, COHEN SM, HOLLANDER JA den (1979) Cellular applications of ^{31}P and ^{13}C nuclear magnetic resonance. Science 205: 160-166
201. SILVER IA (1985) pO_2 and pH in human brain tumors. Adv Exp Med Biol (im Druck)
202. SOBER HA (1970) Handbook of Biochemistry. CRC Press, Cleveland
203. SÖRENSEN SPL, JÜRGENSEN E (1911) Über die Hitzekoa-
gulation der Proteine. Biochem Z 314: 397-442
204. SOLESVIK OV, ROFSTAD EK, BRUSTAD T (1982) Vascular structure of five human malignant melanomas grown in athymic nude mice. Br J Cancer 46: 557-567
205. SONG CW (1984) Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment: a review. Cancer Res (Suppl) 44: 4721s-4730s
206. SONG CW, KANG MS, RHEE JG, LEVITT SH (1980a) The effect of hyperthermia on vascular funktion, pH, and cell survival. Radiology 137: 795-803
207. SONG CW, RHEE JG, LEVITT SH (1980b) Blood flow in normal tissues and tumors during hyperthermia. J Natl Cancer Inst 64: 119-124
208. SONG CW, RHEE JG, LEVITT SH (1982) Changes in intra-tumor pH by hyperthermia. 2nd Ann Meet North American Hyperthermia Group, Salt Lake City, Abstract Nr. 113

209. STADIE WC, MARTIN KA (1924) The thermodynamic relations of the oxygen and base combining properties of blood. J Biol Chem 60: 191-235
210. STORM FK (1983) Hyperthermia in cancer therapy. Hall Publishers, Boston
211. STREFFER C (1985) Mechanisms of heat injury. In: Overgaard J (ed.) Hyperthermic Oncology, Vol. II, Taylor and Francis, London, Philadelphia, pp. 213-222
212. STREFFER C, BEUNINGEN D van, DIETZEL F, RÜTTINGER E, ROBINSON JE, SCHERER E, SEEGER S, TROTT KH (1978) Cancer therapy by hyperthermia and radiation. Urban und Schwarzenberg, Baltimore, München
213. STREFFER C, HENGSTEBECK S, TAMULEVICIUS P (1981) Metabolic studies in an experimental tumor and liver of mice after hyperthermia and glucose. Strahlentherapie 157: 623
214. STAMM O, LATSCHA U, JANECEK P, CAMPANA A (1976) Development of a special electrode for continuous subcutaneous pH measurement in the infant scalp. Am J Obstet Gynecol 124: 193-195
215. SUIT HD (1977) Hyperthermic effects on animal tissues. Radiology 123: 483-487
216. TAGASHIRA Y, YASUHIRA K, MATSUO H, AMANO S (1953) Continual pH measuring by means of inserted microglass electrode in living normal and tumor tissues (1st reprot). Gann 44: 63-64

217. TAGASHIRA Y, TAKEDA S, KAWANO K, AMANO S (1954) Continuous pH measuring by means of microglass electrode inserted in living normal and tumor tissues (2nd report), with an additional report on interaction of SH-group of animal protein with carcinogenic agent in the carcinogenic mechanism. *Gann* 45: 99-101

218. TAYLOR IW, HODSON PJ (1984) Cell cycle regulation by environmental pH. *J Cell Physiol* 121: 517-525

219. THISTLETHWAITE AJ, LEEPER DB, MOYLAN DJ, NERLINGER RE (1984) pH distribution in human tumors. 4th Ann Meet North American Hyperthermia Group, Orlando, Abstract Nr. Bi - 2

220. TILGEN W, BONKAMP P, BREITKREUZ D, DZARLIEVA RT, ENGSTNER M, HAAG D, FUSENIG NE (1983) Preservation of morphological, functional, and karyotypic traits during long-term culture and in vivo passage of two human skin squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 43: 5995-6011

221. THOMAS JA, BUCHSBAUM RN, ZIMNIAK A, RACKER E (1979) Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry* 18: 2210-2218

222. TURANO C, FERRARO A, STORM R, CAVALIERE R, ROSSI-FANELLI A (1970) The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells. III. Studies on lysosomes. *Eur J Cancer* 6: 67-72

223. TURNER GA (1979) Increased release of tumor cells by collagenase at acid pH: a possible mechanism for metastasis. *Experientia* 35: 1657-1658

224. URANO M, KAHN J (1985) Effect of 42 °C hyperthermia on murine normal and tumor tissues. *Cancer Res* 45: 2527-2532
225. VAUPEL P (1974) Atemgaswechsel und Glucosestoffwechsel von Implantationstumoren (DS-Carcinosarkom) in vivo. *Funktionsanalyse biolog Systeme* 1: 1-138
226. VAUPEL P (1977) Hypoxia in neoplastic tissue. *Microvasc Res* 13: 399-408
227. VAUPEL P (1979) Oxygen supply to malignant tumors. In: Peterson HI (ed.) *Tumor blood circulation: Angiogenesis, vascular morphology, and blood flow of experimental and human tumors*. CRC Press, Boca Raton, pp. 143-168
228. VAUPEL P (1982a) Pathophysiologie der Durchblutung maligner Tumoren. *Funktionsanalyse biolog Systeme* 8: 155-170
229. VAUPEL P (1982b) Einfluß einer lokalisierten Mikrowellenhyperthermie auf die pH-Verteilung in bösartigen Tumoren. *Strahlentherapie* 158: 168-173
230. VAUPEL P, THEWS G (1976) Pathophysiological aspects of glucose uptake by the tumor tissue under various conditions of oxygen and glucose supply. *Adv exp Med Biol* 75: 547-533
231. VAUPEL P, HAMMERSEN F (Hrsg.) (1983) *Mikrozirkulation in malignen Tumoren*. Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Tokyo, Sydney
232. VAUPEL P, MÜLLER-KLIESER W (1983) Interstitieller Raum und Mikromilieu in malignen Tumoren. *Mikrozirk Forsch Klin* 2: 78-90

233. VAUPEL P, KALLINOWSKI F (1985) Physiological effects of hyperthermia. Rec Res Cancer Res (im Druck)
234. VAUPEL P, GÜNTHER H, GROTE J, SCHWARZ W (1971) Der Einfluß erhöhter arterieller CO₂-Drucke auf die Sauerstoff- und Glukoseaufnahme des DS-Carcinosarkoms in vivo. Z Krebsforsch 76: 8-15
235. VAUPEL P, OSTHEIMER K, MÜLLER-KLIESER W (1980) Circulatory and metabolic responses of malignant tumors during localized hyperthermia. J Cancer Res Clin Oncol 98: 15-29
236. VAUPEL P, FRINAK S, BICHER HI (1981) Heterogeneous oxygen partial pressure and pH distribution in C3H mouse mammary adenocarcinoma. Cancer Res 41: 2008-2013
237. VAUPEL P, FRINAK S, MÜLLER-KLIESER W, BICHER HI (1982a) Impact of localized hyperthermia on the cellular microenvironment in solid tumors. Natl Cancer Inst Monogr 61: 207-209
238. VAUPEL P, OTTE J, MANZ R (1982b) Oxygenation of malignant tumors after localized microwave hyperthermia. Radiat Environment Biophys 20: 289-300
239. VAUPEL P, BENZING H, EGELHOF E, MÜLLER-KLIESER W, MÜLLER-SCHAUENBURG W (1983a) The effect of various thermal doses on the regional tumor blood flow measured by heat clearance. Strahlentherapie 159: 384
240. VAUPEL P, MÜLLER-KLIESER W, GABBERT H (1983b) Experimental evidence for a hyperthermia-induced breakdown of tumor blood flow during normoglycemia. J Cancer Res Clin Oncol 105: 303-304

241. VAUPEL P, MÜLLER-KLIESER W, OTTE J, MANZ R, KALLINOWSKI F (1983c) Blood flow, tissue oxygenation, and pH-distribution in malignant tumors upon localized hyperthermia. *Strahlentherapie* 159: 73-81
242. VAUPEL P, DAVE S, KALLINOWSKI F (1985a) Sauerstoff-Versorgung xenotransplantierte menschlicher Mammakarzinome. Workshop des Max-Planck-Institutes für Systemphysiologie, Dortmund
243. VAUPEL P, KALLINOWSKI F, DAVE S, GABBERT H, BASTERT G (1985b) Human mammary carcinomas in nude rats - a new approach for investigating oxygen transport and substrate utilization in tumor tissues. *Adv exp Med Biol* (im Druck)
244. VAUPEL P, KALLINOWSKI F, KLUGE M, MENKE H (1985c) Pathophysiologische Aspekte der Hyperthermiewirkung in malignen Tumoren. Durchblutungsänderungen in Xenotransplantaten menschlicher Mammakarzinome. In: Streffer C, Herbst M, Schwabe HW (Hrsg.) Lokale Hyperthermie, Deutscher Ärzte-Verlag, Köln (im Druck)
245. VIDYASAGER D, BHAT R, RAJU TNK, ASONYE U, PAPAZAFIRATOU C (1979) Continuous tissue pH (tpH) monitoring in sick neonates. *Pediat Res* 13: 509
246. VOEGTLIN C, FITCH RH, KAHLER H, THOMPSON JW (1935) Experimental studies on cancer. I. The influence of the parenteral administration of certain sugars on the pH of malignant tumors. *Natl Inst Health Bull* 164: 1-14
247. VOEGTLIN C, KAHLER H (1932) The estimation of the hydrogenion concentration of the tissues in living animals. *Science* 75: 362-364

248. WADDEL WJ, BATES RG (1969) Intracellular pH. *Physiol Rev* 49: 285-329
249. WIKE-HOOLEY JL, HAVEMAN J, REINHOLD HS (1984a) The relevance of tumor pH to the treatment of malignant disease. *Radiother Oncol* 2: 343-366
250. WIKE-HOOLEY JL, ZEE J van der, RHOON GC van, BERG AP van den, REINHOLD HS (1984b) Human tumor pH changes following hyperthermia and radiation therapy. *Europ J Cancer Clin Oncol* 20: 619-623
251. WIKE-HOOLEY JL, BERG AP van den, ZEE J van der, REINHOLD HS (1985) Human tumor pH and its variations. *Europ J Cancer Clin Ocol* 21: 785-793
252. WILHELM G, SCHULZ J, HOFMANN E (1971) pH-dependence of aerobic glycolysis in Ehrlich ascites tumor cells. *FEBS letters* 17: 158-162
253. WILLIAMSON JR, SHANAHAN MO, HOCHMUTH RM (1975) The influence of temperature on red cell deformability. *Blood* 46: 611-624
254. YATVIN MB, KREUTZ W, HORWITZ BA, SHINITZKY M (1980) pH-sensitive liposomes: possible clinical implications. *Science* 210: 1253-1255
255. YI PN (1979) Cellular ion content changes during and after hyperthermia. *Biochem Biophys Res Comm* 91: 177-181
256. YI PN, CHANG CS, TALLEN M, BAYER W, BALL S (1983) Hyperthermia-induced intracellular ionic level changes in tumor cells. *Radiat Res* 93: 534-544

257. YI PN, FENN JO, JARRETT JH (1985) Hyperthermia and osmoregulation. 33rd Ann Meeting Radiat Res Soc, Los Angeles, Abstract Ac 20
258. YOUNG S, HALLOWES RC (1973) Tumours of the mammary gland. In: Turusov VS (ed.) Pathology of tumours in laboratory animals. Bd. 1/1. IARC No. 5, Lyon, pp. 31-52
259. ZYWIETZ F, KNÖCHEL R (1985) The role of dielectric properties by heating a rat tumour. Strahlentherapie 161: 556
260. ZWARTOUW HT, WESTWOOD JCN (1958) Factors affecting growth and glycolysis in tissue culture. Brit J exp Pathol 39: 529-539

Tabellarischer Lebenslauf

07.10.1959	Geboren in Neustadt a.d.Weinstraße als zweiter Sohn des Zollinspektors Manfred KALLINOWSKI und seiner Ehefrau Ruthild, geb. Weitlauff
1966 - 1969	Besuch der Volksschule in Forst/Weinstraße
1969 - 1977	Besuch des altsprachlich - neusprachlichen Gymnasiums in Neustadt a. d. Weinstraße Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
1977- 1982	Studium der Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
1979	Ärztliche Vorprüfung
1980	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1982	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1982 - 1983	Studium der Medizin in Australien an den Medical Schools der Universitäten in Perth, Melbourne, Sydney und Adelaide. Diese Zeit wurde mir als Praktisches Jahr anerkannt.
Okt. 1983	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Nov. 1983	Approbation
	Während meines Studiums wurde ich als Stipendiat von der Studienstiftung des Deutschen Volkes gefördert.
seit Nov. 1983	Tätigkeit als Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Physiologischen Institut (Direktor: Prof. Dr.Dr.G.Thews) und in der Abteilung für Angewandte Physiologie (Leiter: Prof.Dr.P.Vaupel) der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.P.VAUPEL, der mir die Möglichkeit zu wissenschaftlicher Arbeit eröffnete und der mich während der Durchführung der Arbeit fachlich wie menschlich in besonderer Weise unterstützte.

Herrn Prof.Dr.Dr.G.THEWS danke ich für die freundliche Aufnahme in das Physiologische Institut und für die Erstellung des zweiten Gutachtens.

Weiter möchte ich Herrn Prof.Dr.H.GABBERT, Pathologisches Institut der Universitätskliniken Mainz, für die Hilfe bei der Durchführung histologischer Arbeiten und Herrn Dr. WEISSE, Abteilung für Pathologie der Böhringer Ingelheim KG, für die Begutachtung und Klassifizierung der untersuchten Spontantumoren herzlich danken.

Herrn Privatdozent Dr. H.-P.FORTMEYER, Leiter der Tierversuchsanlage der Universitätskliniken Frankfurt/Main, bin ich für die großzügige Hilfe bei der Haltung von (rnu/rnu)-Ratten sehr verbunden.

Herrn Dr.BERRES, Institut für medizinische Statistik und Dokumentation der Universität Mainz, danke ich für die wertvollen Hinweise bei der Auswertung und der Erstellung der Ergebnisse.

Addendum

Nach Fertigstellung dieser Arbeit ist folgende Publikation erschienen:

THISTLETHWAITE AJ, LEEPER DB, MOYLAN DJ, NERLINGER RE (1985)
pH distribution in human tumors. Int J Radiat Oncol Biol
Phys 11: 1647-1652

In dieser Untersuchung wurden mit einer vergleichbaren Glas-pH-Elektrode 53 pH-Werte in 14 menschlichen Tumoren in Patienten gemessen. Die Autoren fanden einen mittleren pH-Wert von $6,81 \pm 0,66$. Ein alkalischer pH-Wert von 7,69 wird von den Autoren auf ausgeprägte Nekrosezonen in dem betreffenden Tumor zurückgeführt. Bei 4 Tumoren wurde der Einfluß einer Wärmebehandlung auf den Tumor-pH-Wert untersucht, wobei 3 Tumoren unter der Hyperthermie einen pH-Anstieg von 0,25 bis 0,54 pH-Einheiten erkennen lassen. Allerdings wird in keinem der überwärmten Tumoren eine mittlere Tumortemperatur von $41,6^{\circ}\text{C}$ überschritten.

Die berichteten Befunde stimmen somit mit den in der vorliegenden Arbeit unter Normalbedingungen gefundenen Ergebnissen überein und belegen die Anwendbarkeit der verwendeten Technik und der Xenotransplantation menschlicher Tumoren für die systematische Untersuchung der pH-Verteilung in menschlichen Tumoren in situ unter kontrollierten systemischen Bedingungen.

